

ANNE CAROLINA ELEUTÉRIO LEITE

EFEITOS DA TERAPIA PERIODONTAL NA CONTAGEM DE LEUCÓCITOS E  
NÍVEIS DO FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR BETA NO SORO DE  
INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE SEVERA

BRASÍLIA, 2015

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANNE CAROLINA ELEUTÉRIO LEITE

EFEITOS DA TERAPIA PERIODONTAL NA CONTAGEM DE LEUCÓCITOS E  
NÍVEIS DO FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR BETA NO SORO DE  
INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE SEVERA

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do  
Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de  
Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Maria do Carmo Machado Guimarães

Co-Orientadora: Profa. Dra. Valéria Martins de Araújo

BRASÍLIA

2015

ANNE CAROLINA ELEUTÉRIO LEITE

EFEITOS DA TERAPIA PERIODONTAL NA CONTAGEM DE LEUCÓCITOS E  
NÍVEIS DO FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR BETA NO SORO DE  
INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE SEVERA

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do  
Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de  
Brasília.

Aprovado em 27 de maio de 2015

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria do Carmo Machado Guimarães – (presidente)

Universidade de Brasília (UnB-DF) / Faculdade de Ciências da Saúde

Profa. Dra. Taia Maria Berto Rezende

Universidade de Brasília (UnB-DF) / Faculdade de Ciências da Saúde

Profa. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

Faculdade de Odontologia de Bauru / Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Cristine Miron Stefani

Universidade de Brasília (UnB-DF) / Faculdade de Ciências da Saúde

Prof. Dr. Eric Jacomino Franco

Universidade Católica de Brasília (UCB-DF) / Escola Saúde – Odontologia

Profa. Dra. Tatiana Degani Paes Leme Azevedo – (suplente)

Universidade Católica de Brasília (UCB-DF) / Escola Saúde – Odontologia

*Dedico este trabalho a minha família e Professora Mestre Luciana Freitas Bezerra.*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos pacientes que participaram deste estudo, pela colaboração durante todas as fases do mesmo.

À Profa. Dra. Maria do Carmo Machado Guimarães, pela brilhante orientação deste trabalho. Pela dedicação, ensinamentos, seriedade, primazia sobre a língua portuguesa e, especialmente, pela condução do mesmo baseada na confiança, amizade e notável competência, excelência e inteligência. Obrigada pelo apoio constante a minha carreira docente e por ter sido parte fundamental para meu ingresso nesta. Obrigada pelo também ensejo em estender a pesquisa de Mestrado para obtenção de novos resultados.

À Profa. Dra. Valéria Martins de Araújo, co-orientadora deste estudo, parte essencial do vislumbamento, delineamento e desfecho deste. Por toda experiência transmitida durante todas as etapas, clínicas e laboratoriais, pela colaboração na elaboração desta tese e, principalmente, pela oportunidade de pesquisar sobre este assunto como uma extensão da dissertação de Mestrado. Obrigada pela participação marcante, ensinamentos e amizade durante estes anos de convivência.

Ao Prof. Dr. Eduardo Freitas da Silva, pela orientação da parte estatística deste estudo, pela disposição memorável e sugestões engrandecedoras durante o percurso dos desfechos do mesmo.

À Dângela e Mariah, companheiras cirurgiãs dentistas, durante a fase clínica deste estudo. Foi um imenso prazer tê-las conhecido. Obrigada pela troca de conhecimentos.

Ao Robério e André, técnicos do laboratório de exames hematológicos do HUB-DF, pela colaboração na execução e entendimento dos exames efetuados.

Ao meu cunhado Derrick Mulder e minha irmã Profa. Dra. Kelly Cristina Leite Mulder, partes essenciais deste projeto e vida, pela inestimável ajuda nas traduções do inglês para o português. Obrigada pelo carinho e consideração. Obrigada minha

irmã pela parceria, companheirismo e amor por toda a vida. Dou graças ao sorriso da minha amada afilhada durante todos os momentos difíceis que passei.

À Profa. Me. Luciana Freitas Bezerra, por ser um ser humano nobre e fundamental em todas as etapas da minha vida profissional e emocional. Obrigada pela sabedoria, perspicácia, afeto e amizade incondicional. Obrigada por estar ao lado sempre e para sempre.

A todos os Professores, colegas e amigos da UCB-DF, em especial, Prof. Dr. Eric Jacomino Franco e Prof. Dr. Daniel Rey de Carvalho, pela confiança em meu trabalho, amizade e constante aprendizado na Periodontia e formação superior. À Profa. Dra. Ana Carolina Morandini pela parceria e aprendizado na disciplina de Periodontia da UCB e pela condução de parte desta pesquisa no laboratório de imunologia molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF-UFRJ). Também estendo este agradecimento ao Dr. Erivan Schnaider Ramos-Junior pela colaboração em parte desta pesquisa (IBCCF-UFRJ).

Às minhas queridas amigas Júlia, Larissa, Alessandra, Graziela, Elaine, Patrícia, Danielle, que participaram intensivamente com muito carinho, respeito e amizade durante estes anos de muito estudo e dedicação. A todas vocês que alimentam a vitalidade e felicidade interior em possuírmos uma verdadeira, profunda e eterna amizade.

À minha família, pais, irmãos e afilhada Katarina, pelo apoio logístico, emocional e amor incondicional dedicados. Obrigada por permanecerem ao lado em todos os meus passos e sonhos. A Solon Filho e Katarina, nossos maiores presentes nesta vida.

À minha madrinha Rita, Tia Cida e primas Júlia, Nádia e Luíza por serem parte indissociável de minha vida.

A música e poesia desta doce vida.

A Deus, sinônimo de minha única força interior.

*Todo caminho da gente é resvaloso. Mas também, cair não prejudica demais. A gente levanta, a gente sobe, a gente volta!... O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: Esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, Sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. Ser capaz de ficar alegre e mais alegre no meio da alegria, E ainda mais alegre no meio da tristeza... ROSA, J.G. **Grande Sertão:** Veredas. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 2005.*

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da terapia periodontal não cirúrgica na contagem de células brancas do sangue (WBC) e níveis de fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) no soro de indivíduos com periodontite grave. O soro de 28 indivíduos (idade média:  $34,36 \pm 6,24$ ; 32% homens) com periodontite (14 pacientes com diagnóstico de periodontite crônica generalizada [GCP]; 8 pacientes com periodontite agressiva generalizada [GAgP]; 6 com periodontite agressiva localizada [LAgP]) e 27 controles saudáveis (idade média:  $33,18 \pm 6,42$ ; 33% homens) foi coletado antes da terapia periodontal. Novas amostras de sangue foram obtidas dos 23 indivíduos (12 pacientes com GCP, 5 com GAgP e 6 com LAgP) que completaram o tratamento periodontal (entre 9-12 meses após). Todos os pacientes eram não fumantes, não usavam qualquer medicação e não tinham história ou sinais e sintomas detectáveis de doenças sistêmicas. Um protocolo de tratamento periodontal bem controlado foi estabelecido em três estágios: terapia periodontal mecânica (raspagem e alisamento radicular) por  $\leq 14$  dias, reinstrumentação de sítios (3-6 meses) e terapia periodontal de suporte (SPT) por 6 meses. Parâmetros periodontais (profundidade de sondagem, sangramento à sondagem, nível de inserção clínica, índice de placa) e sistêmicos, tais como, o número total de WBCs e níveis de TGF- $\beta$ , uma citocina pleiotrópica produzida por células T reguladoras (Tregs), acessados pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) foram incluídos. Houve decréscimo de todos os parâmetros clínicos periodontais pós-terapia ( $p < 0,0001$ ). Quando todas as formas de periodontite (GCP, GAgP, LAgP) foram consideradas um só grupo não houve diferença estatística na contagem de WBC entre os indivíduos com periodontite e controle tanto antes como pós-terapia. No entanto, após a terapia, o valor médio correspondente aos linfócitos, em pacientes com LAgP, foi estatisticamente maior que o valor médio em pacientes com GCP ( $p < 0,0357$ ). Adicionalmente, os níveis de TGF- $\beta$ , em pacientes com LAgP e GCP, foram maiores comparados aos controles anteriormente à terapia ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente). Para os grupos de doença, não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis séricos de TGF- $\beta$  após a terapia periodontal.



Em pacientes com LAgP, a terapia periodontal foi associada com o acréscimo do número de linfócitos no sangue periférico. O ensaio clínico foi registrado no <http://www.clinicaltrials.gov.br/>, No. RBR-24T799.

Palavras-chave: inflamação; periodontite; contagem de leucócitos; fator de crescimento transformador beta.

## ABSTRACT

This study aimed to investigate the effects of nonsurgical periodontal therapy on white blood cell (WBC) count and levels of transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) in serum from subjects with severe periodontitis. Serum from 28 subjects with periodontitis (mean age:  $34.36 \pm 6.24$ ; 32% men; 14 patients diagnosed with generalized chronic periodontitis [GCP]; 8 generalized aggressive periodontitis [GAgP] patients; 6 localized aggressive periodontitis [LAgP] patients) and 27 healthy controls (mean age:  $33.18 \pm 6.42$ ; 33% men) were collected prior to periodontal therapy. Blood samples were obtained from 23 subjects (12 GCP patients, 5 GAgP patients and 6 LAgP patients) who completed therapy (9-12 months). All patients were nonsmokers, were not under medication, and had neither history nor detectable symptoms of systemic diseases. A well-controlled periodontal treatment protocol was established in three stages: mechanical periodontal therapy (scaling and root planning) for  $\leq 14$  days, reinstrumentation of sites (3-6 months), and supportive periodontal therapy (SPT) for 6 months. Periodontal (probing depth, bleeding on probing, clinical attachment level, plaque index) and systemic parameters such as the total number of WBCs and TGF- $\beta$  levels, a pleiotropic cytokine produced by regulatory T cells (Tregs), accessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were included. After therapy, all clinical periodontal parameters decreased ( $p < 0.0001$ ). When all forms of periodontitis (GCP, GAgP, LAgP) were grouped together, there were no statistical differences in WBC count between experimental and control groups before or after therapy. However, after therapy, the mean value of lymphocytes in LAgP patients was statistically higher than that of patients with GCP ( $p < 0.0357$ ). Additionally, TGF- $\beta$  levels in LAgP and GCP patients were higher compared to controls before therapy ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively). For the disease groups, TGF- $\beta$  serum levels were statistically unchanged after periodontal treatment. In LAgP patients, periodontal therapy was associated with increased number of lymphocytes in peripheral blood. The clinical trial was registered at <http://www.clinicaltrials.gov.br/>, No. RBR-24T799.

Keywords: inflammation; periodontitis; leukocyte count; transforming growth factor beta.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Flowchart delineamento do estudo

Figura 2 – Protocolo de tratamento (Grupo periodontite)

Figura 3 – Níveis séricos de TGF- $\beta$  pré e pós-tratamento

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Parâmetros clínicos bucais pré e pós-terapia periodontal de suporte.

Tabela 2 – Parâmetros hematológicos pré e pós-terapia periodontal de suporte.

Tabela 3 – Parâmetros clínicos bucais pré e pós-terapia periodontal de suporte nos subgrupos periodontite.

Tabela 4 – Parâmetros hematológicos pré e pós-terapia periodontal de suporte nos subgrupos periodontite.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa – *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

AgP – periodontite agressiva

APCs – células apresentadoras de antígenos

CD – *cluster of differentiation* – grupo de diferenciação

Células T  $\gamma\delta$  – subpopulação de linfócitos “inatos-semelhantes”

Células Th – células T auxiliares

CP – periodontite crônica

CRP – proteína C-reativa

DCV – doença cardiovascular

DP – doença periodontal

ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay* – ensaio imunoenzimático

FCG – fluido crevicular gengival

GAgP – periodontite agressiva generalizada

GCP – periodontite crônica generalizada

hs-CRP – proteína C-reativa ultrassensível

IFN – interferon

Ig – imunoglobulina

IL – interleucina

IMC – índice de massa corporal

IP – índice de placa

LA<sub>g</sub>P – periodontite agressiva localizada

LPS – lipopolissacarídeo

MHC – complexo principal de histocompatibilidade

MMPs – metaloproteinases da matriz

ND – número de dentes

NF $\kappa$ B – fator nuclear do fator de transcrição  $\kappa$ B / fator nuclear kappa beta

NIC – nível de inserção clínica

OCP – precursores de osteoclastos

OPG – osteoprotegerina

PAMPs – padrões moleculares associados a patógenos

PCR – reação em cadeia da polimerase

*Pg* – *Porphyromonas gingivalis*

PGE<sub>2</sub> – prostaglandina E<sub>2</sub>

PGN – peptidoglicano

PMNs – polimorfonucleares

PRRs – receptores de reconhecimento de padrões

PS – profundidade de sondagem

RANK – receptor ativador de fator nuclear kappa beta (NF $\kappa$ B)

RANKL – ligante do receptor ativador de fator nuclear kappa beta (NF $\kappa$ B)

SAS – sangramento à sondagem

SPT – terapia periodontal de suporte

TCR – receptor de célula T

TGF- $\beta$  – fator de crescimento transformador beta

TLRs – receptores *Toll-like*

TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa

Tregs – células T reguladoras

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

WBC – células brancas do sangue



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	18
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	23
2.1 CLASSIFICAÇÃO DAS DOENÇAS PERIODONTAIS E ASSOCIAÇÕES MICROBIOLÓGICAS	23
<b>2.1.1 O Desafio Microbiano: Mecanismos Celulares e Moleculares na Inflamação Periodontal e Perda Óssea</b>	26
2.1.1.1 Resposta Local e Sistêmica da Doença Periodontal	35
<b>3 OBJETIVOS</b>	38
3.1 OBJETIVO GERAL	38
<b>3.1.1 Objetivos Específicos</b>	38
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	39
4.1 INDIVÍDUOS E GRUPOS DE ESTUDO	39
<b>4.1.1 Exame Clínico</b>	41
4.1.1.1 Protocolo de Tratamento e Análise Laboratorial	42
4.1.1.1.1 <i>Análise Estatística</i>	44
<b>5 RESULTADOS</b>	46
5.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E CLÍNICOS BUCAIS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO PRÉ E PÓS-TERAPIA PERIODONTAL NÃO CIRÚRGICA	46
<b>5.1.1 ELISA pré e pós-Terapia Periodontal Não Cirúrgica</b>	51
<b>6 DISCUSSÃO</b>	53
<b>7 CONCLUSÕES</b>	60
<b>REFERÊNCIAS</b>	61
<b>ANEXOS</b>	70
<b>ANEXO A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA</b>	70
<b>ANEXO B – ARTIGO PUBLICADO</b>	71
<b>ANEXO C – ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO</b>	80

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças periodontais (DP) representam a manifestação patológica da resposta imunoinflamatória do hospedeiro frente ao desafio microbiano na interface dentogengival. Variações individuais de resposta podem ser explicadas pela conjunção de fatores, que conferem às mesmas uma natureza complexa. Entre esses fatores, destacam-se susceptibilidade, atribuída especialmente a polimorfismos genéticos, fatores ambientais e virulência (1).

As formas graves de DP são conhecidas por afetarem até 15% da maioria das populações (2,3). No Brasil, a mais recente Pesquisa Nacional de Saúde Bucal – 2010, conhecida como Projeto SBBrasil 2010, analisou a situação da população brasileira com relação à cárie dentária e doenças periodontais, dentre outros aspectos. Um dos principais resultados apresentados, refere-se à distribuição das formas mais graves da DP de modo mais significativo nos adultos com idade de 35 a 44 anos, nos quais se observa uma prevalência de 19,4% (4).

O termo periodontite reúne, genericamente, formas crônicas de DP, que resultam de uma infecção polimicrobiana e se caracterizam por perda de fibras colágenas e de inserção à superfície cementária, migração apical do epitélio juncional, formação de bolsa periodontal e reabsorção do osso alveolar. Tais danos comprometem, parcial ou totalmente, a função dos tecidos periodontais e podem resultar na perda do dente quando a doença segue curso natural (1).

Sabe-se que a carga microbiana não é rotineiramente aumentada em pacientes com periodontite mais grave. Uma explicação alternativa para estes achados foi apresentada, ainda em 1994, por Haffajee; Socransky (5), ao afirmarem que a qualidade da ecologia microbiana confere maior probabilidade de manifestações sistêmicas dessa infecção localizada. Outra explicação apresentada, no mesmo ano, por Hernichel-Gorbach *et al.* (6), sugere a existência de um subgrupo de indivíduos de alto risco com susceptibilidade aumentada. Tal susceptibilidade foi atribuída a características alteradas de resposta inflamatória local e/ou sistêmica. Portanto, ambos aspectos, microbiota e alto risco podem estar

implicados nas variações de resposta do hospedeiro que contribuem para o aumento da susceptibilidade ou resistência à progressão da periodontite (7).

Mais de 700 espécies bacterianas podem ocupar as bolsas periodontais (8) e a combinação de uma microbiota aeróbia e anaeróbia é tipicamente vista na infecção. Substancial destruição tecidual em pacientes com periodontite grave caracteriza-se, em muitos casos, pela presença de bolsas periodontais profundas ao redor de muitos ou de todos os dentes. As lesões epiteliais agregadas equivalem, em tamanho, a uma ferida ulcerada com área de 8 cm<sup>2</sup> a 20 cm<sup>2</sup>, de acordo com estimativas clínicas (9). No entanto, a doença pode permanecer assintomática por décadas, tempo durante o qual sua detecção é feita apenas por exame clínico com sonda periodontal e/ou com radiografias intrabuciais (9). Dessa forma, a natureza crônica e cíclica da condição periodontal oferece oportunidade para repetida disseminação hematogênica de patógenos periodontais, antígenos bacterianos e mediadores inflamatórios (10,11).

Adicionalmente, a invasão e multiplicação de micro-organismos patogênicos em uma parte do corpo ou tecido, como ocorre na periodontite, podem produzir aos tecidos subsequentes prejuízo e progressão de outras doenças por meio de uma variedade de mecanismos celulares ou humorais (1,12). Evidências, desde o início da década de 1990, apontam a DP como um fator de risco para condições sistêmicas, como doenças cardiovasculares (DCV), desfechos adversos da gravidez, diabetes e doença pulmonar (13).

Recentemente, uma revisão da evidência em associações entre DP e doenças e condições sistêmicas especialmente doença respiratória, doença renal crônica, artrite reumatóide, comprometimento cognitivo, obesidade, síndrome metabólica e cancer foi também elaborada. Houve forte evidência em que melhora da higiene bucal tem efeitos positivos na prevenção de pneumonias nosocomiais. As evidências publicadas suportam associações modestas entre periodontite e doença renal crônica e obesidade e associações fracas entre periodontite e comprometimento cognitivo, artrite reumatóide e síndrome metabólica (11).

Na saúde gengival, o epitélio sulcular e imunidade inata local agem como uma barreira natural que previne a penetração bacteriana. Nesta condição, apenas um pequeno número de bactérias, maioria anaeróbias facultativas, é encontrado no fluido crevicular gengival (FCG) e corrente sanguínea. No entanto, na DP, o epitélio

da bolsa subgengival ulcerado e inflamado é vulnerável à bactéria e provém uma porta de entrada aos tecidos subsequentes (11).

As bactérias e antígenos bacterianos que são sistemicamente dispersos provocam inflamação sistêmica significativa. Leucócitos, células endoteliais e hepatócitos respondem a fatores de virulência com secreção de mediadores pró-inflamatórios do sistema imunológico (citocinas, quimiocinas, proteína C-reativa [CRP]). Com a exposição continuada, antígenos solúveis reagem com anticorpos circulantes específicos para formar complexos imunes que amplificam a inflamação nos locais de deposição. Da mesma forma, os mediadores pró-inflamatórios, tais como a interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), entre outros, produzidos localmente nos tecidos gengivais inflamados podem "avançar" para a circulação sistêmica. As citocinas pró-inflamatórias na circulação induzem leucocitose e proteínas de fase aguda (p. ex. CRP) (11).

Neste contexto, o aumento do número de células brancas do sangue (WBC) está associado ao risco aumentado de doença cardíaca coronária, DCV, aterosclerose, trombose e isquemia do miocárdio. Este aumento pode ser causado pela natureza inflamatória de infecções crônicas como a periodontite (14).

As células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> que expressam o fator de transcrição Foxp3 são células T reguladoras (Tregs) que impedem uma resposta imunológica adaptativa hiperativa e podem ser associadas com a DP e a sua atenuação. Estas regulam especificamente a ativação, proliferação e função efetora de células T ativadas, e restabelecimento da homeostase após a infecção (15,16). Na presença de Tregs nota-se uma diminuição dos níveis de interferon gama (IFN- $\gamma$ ), IL-17, TNF e IL-1 $\beta$  nos locais da DP (17). As citocinas produzidas por Tregs são IL-10, fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) e linfócito T associado à molécula 4 (CTLA-4), os quais, em geral, subregulam a inflamação. IL-10, TGF- $\beta$ 1 e CTLA-4 são relatados a diminuir a progressão da DP (11). Além do papel protetor no dano tecidual periodontal, as Tregs também desempenham papel importante na tolerância imunológica (18). Também, o TGF- $\beta$  tem sido estudado como uma forma de tratamento no contexto da cura e regeneração do osso periodontal (17). Por exemplo, Tregs modulam negativamente citocinas pró-inflamatórias responsáveis pela inibição de vários processos durante a regeneração do tecido.

Dessa forma, também a resposta sistêmica à periodontite apresenta variação individual e pode ser modulada por aspectos genéticos (polimorfismos e fenótipo hiperinflamatório) e fatores ambientais (por exemplo, o tabagismo ou obesidade) (19-21). Os indivíduos afetados pela doença compartilham polimorfismos comuns em genes específicos considerados importantes na regulação da resposta inflamatória (22,23). No entanto, os determinantes de susceptibilidade para a DP destrutiva não são bem definidos (11).

A terapia periodontal não cirúrgica atua na redução de marcadores de inflamação no sangue (CRP, IL-6, entre outros) e revela alguns aspectos importantes sobre o alcance sistêmico da inflamação periodontal (22,24,25). Dessa forma, partindo do conceito de resolução da doença, instituiu-se neste estudo que a terapia periodontal seria considerada concluída somente após se confirmar a remissão dos sinais clínicos de inflamação, tais como ausência de sangramento à sondagem (SAS) e bolsas periodontais residuais. Contudo, ressalta-se que a remoção mecânica do biofilme por meio da raspagem e alisamento radicular associada ou não a outra modalidade coadjuvante não significa que, em alguma magnitude, a inflamação/infecção não persistam. Por vezes, a remoção dos fatores locais é alcançada somente após repetidas atuações pontuais nos sítios em que ainda existam sinais clínicos de inflamação. Sítios com bolsas periodontais residuais, que continuem sangrando à sondagem requerem, indubitavelmente, nova instrumentação (raspagem e alisamento radicular) e reforço de instrução de higiene bucal. Além disso, a necessidade de reinstrumentação e resposta clínica são peculiares a cada paciente e, por esta razão, não há como se estabelecer, genericamente, um mesmo tempo de conclusão da terapia para todos os pacientes.

Mediante o exposto, este estudo teve como objetivo investigar os efeitos da periodontite grave, bem como as contribuições da terapia periodontal não cirúrgica na resposta inflamatória sistêmica, quanto aos níveis séricos de TGF- $\beta$  e a contagem de WBC. Além disso, a relação entre número de linfócitos, níveis séricos de TGF- $\beta$  e subgrupos de DP graves (periodontite agressiva generalizada [GAgP], periodontite agressiva localizada [LAgP] e periodontite crônica generalizada [GCP] generalizada) foi explorada. Para isto, a resposta individual de cada paciente à terapia foi considerada, respeitando-se o tempo de resolução da inflamação em cada indivíduo e, a partir desta, o estabelecimento da terapia periodontal de suporte

(SPT), também conhecida como manutenção periodontal, por seis meses.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CLASSIFICAÇÃO DAS DOENÇAS PERIODONTAIS E ASSOCIAÇÕES MICROBIOLÓGICAS

Na prática clínica atual, dois importantes tipos de periodontite são reconhecidos: periodontite crônica (CP) e periodontite agressiva (AgP), terminologia empregada pela Classificação Atual das DP (Academia Americana de Periodontia, AAP, 1999). A CP com maior prevalência em adultos, pode ocorrer também em crianças e adolescentes (26). Nesta, há compatibilidade entre gravidade da destruição óssea e quantidade do biofilme bacteriano dentário e cálculo subgengival, além de taxa de progressão moderada na maioria dos casos. Por outro lado, a AgP se caracteriza pela perda rápida de inserção clínica e osso alveolar. Nota-se características comuns para o diagnóstico da AgP: não contribuição de história médica, perda de inserção rápida e destruição óssea e agregação familiar. Outras características consideradas como secundárias podem ou não estar presentes, como depósitos microbianos não consistentes com a gravidade da destruição periodontal, elevada proporção de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), anormalidades de fagócitos e macrófago de fenótipo hiper-responsivo. De acordo com a AAP, o diagnóstico baseia-se em dados clínicos, radiográficos e histórico do paciente. Ensaio de laboratório podem não ser essenciais no diagnóstico diferencial. Além disso, uma revisão sistemática concluiu que não há nenhuma evidência para suportar a existência de diferença na composição da microbiota subgengival entre as formas de CP e AgP (27). Embora nenhum marcador sistêmico específico tenha sido associado com a gravidade da destruição periodontal, tem sido sugerido que a AgP pode mostrar um perfil sistêmico hiper-responsivo associado à susceptibilidade genética (28). Também, foi sugerido que títulos elevados para Aa e *Porphyromonas gingivalis* (Pg) são sugestivos de DP generalizada e grave (29,30).

Recentemente, diferentes sorotipos de *Pg* têm sido associados à indução de um tipo distinto de resposta imunológica, o que sugere o papel da cápsula durante a ativação das células dendríticas. *Pg*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* foram mais propensos a serem detectados em amostras de biofilme bacteriano subgengival via reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real em locais que experimentaram a progressão da DP do que nos controles correspondentes. Os autores concluíram que os níveis de *Pg* e *T. denticola* no biofilme subgengival são potencialmente úteis para a identificação de locais de risco da progressão da periodontite (31).

Curiosamente, tal como a biomassa bacteriana aumenta com o agravamento da inflamação periodontal clínica, a sucessão ecológica de saúde à doença manifesta-se como emergência de membros da comunidade recém dominantes em vez de aparecimento de novas espécies. Esta importante descoberta torna-se consistente com a hipótese ecológica do biofilme, que prevê que os patógenos periodontais são membros da microbiota normal, mas em níveis muito baixos para causar a doença, enquanto que mudanças nas condições ecológicas poderiam favorecer o crescimento desses micro-organismos, além de um limite suficiente, para levar à periodontite (32).

Ressalta-se que uma hipótese plausível para indivíduos não susceptíveis à periodontite, ou seja, que podem resistir ou tolerar a conversão da microbiota periodontal, de um estado de simbiose para um estado de desequilíbrio na relativa abundância de espécies microbianas dentro do ecossistema que estão associadas com a doença, torna-se em virtude do seu estado imunoinflamatório intrínseco. A identificação de fatores relacionados ao hospedeiro que determinam a sua susceptibilidade à subversão imunológica microbiana poderia fornecer informações úteis, embora tal vulnerabilidade diferencial poderia adicionalmente ou, alternativamente, ser explicada pela diversidade de cepas e virulência dentro da estrutura populacional das bactérias implicadas (32).

A inflamação caracteriza-se como importante fonte de nutrientes (especialmente para as bactérias assacarolíticas que obrigatoriamente dependem de fontes como não carboidratos para a energia) e, portanto, exerce uma poderosa influência na composição da microbiota periodontal favorecendo as espécies que



podem utilizar produtos de degradação do tecido (por exemplo, proteínas degradadas / peptídeos e hemina - uma fonte de ferro essencial). Por outro lado, as espécies que não podem beneficiar dessas mudanças ambientais, ou para as quais a inflamação do hospedeiro é prejudicial, podem ter uma desvantagem de aptidão e, portanto, serem superadas. O crescimento seletivo de bactérias que têm “afinidade pela inflamação”, atuando como patogênicas, tem o potencial de desencadear um “ciclo vicioso” de auto alimentação para posterior destruição do tecido e crescimento excessivo de bactérias (32).

Fatores de virulência, tais como citotoxinas, proteases e hemaglutininas, moléculas estruturais das bactérias, incluindo o lipopolissacarídeo (LPS) e peptidoglicano (PGN), lipoproteínas, DNA bacteriano e RNA de cadeia dupla, interagem com o sistema imunológico do hospedeiro. A maioria dessas moléculas tem *motifs* conservados (domínios conservados) conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que são reconhecidos por receptores de células hospedeiras chamados receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Os PRRs detectam PAMPs no ambiente e ativam vias de sinalização específicas em células hospedeiras que iniciam respostas inflamatórias. Fatores de virulência de bactérias, incluindo PAMPs são LPS, PGN, ácido lipoteicóico (LTA), fímbrias, proteases, proteínas de choque térmico (HSPs), formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) e toxinas. PRRs incluem os receptores Toll-like (TLRs) e uma variedade de receptores acoplados à proteína G (GPCRs). No entanto, é importante notar que a maioria dessas interações propostas foi observada apenas *in vitro* ou em modelos animais (11,33).

Quanto à extensão de acometimento da DP, a CP é classificada como localizada, menos de 30% dos sítios (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual, lingual e distolingual) são afetados, e como generalizada, quando ultrapassa esse limite (34).

A LAgP caracteriza-se pela destruição dos tecidos periodontais localizada no primeiro molar / incisivo com perda de inserção interproximal em pelo menos dois dentes permanentes, sendo um deles o primeiro molar e envolvendo não mais que dois dentes além dos primeiros molares e incisivos. Esta também apresenta forte resposta do anticorpo sérico a agentes infectantes e normalmente é detectada e diagnosticada durante a puberdade em indivíduos sistemicamente saudáveis (34).

A GAgP normalmente afeta indivíduos abaixo de 30 anos, mas pode acometer indivíduos com mais idade. A perda de inserção interproximal caracteriza-se como generalizada quando afeta pelo menos três dentes permanentes, além dos primeiros molares e incisivos e/ou mais de 30% dos sítios. Além disso, nota-se natureza episódica pronunciada da destruição da inserção e do osso alveolar e resposta insuficiente do anticorpo sérico a agentes infectantes (34).

### **2.1.1 O Desafio Microbiano: Mecanismos Celulares e Moleculares na Inflamação Periodontal e Perda Óssea**

Durante a última década, crescentes evidências apóiam a ideia de que as mudanças nas subpopulações de células imunológicas no interior de tecidos periodontais podem ter um impacto importante no fenótipo clínico e na progressão da destruição periodontal. Enquanto os leucócitos polimorfonucleares (PMNs) representam a primeira linha de defesa (imunidade inata) para proteger o hospedeiro de patógenos periodontais, o aumento do número de macrófagos no tecido conjuntivo subepitelial tem sido envolvido na progressão da DP. Estes apresentam-se em um número maior em lesões periodontais ativas em comparação com os sítios inativos. O fenótipo de macrófagos hipersecretores (hiperinflamatórios) foi a hipótese levantada para explicar o aumento da quantidade de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em sítios periodontais em progressão da doença em comparação com sítios inativos e saudáveis. Além disso, o aumento da quantidade de monócitos nos tecidos periodontais pode promover a diferenciação de células de reabsorção óssea (osteoclastos) sob estímulo bacteriano, o que poderia ser responsável pela perda óssea observada em sítios de periodontite progressiva (31).

O envolvimento dos neutrófilos na patogênese de uma doença crônica como a periodontite pode parecer surpreendente, já que os mesmos são geralmente associados com a resposta aguda do hospedeiro a infecções. No entanto, os neutrófilos desempenham um papel cada vez mais reconhecido em doenças

inflamatórias crônicas, como artrite reumatóide e psoríase. Além disso, é incerto se a natureza crônica da periodontite representa um processo patológico constante ou uma série persistente de breves agressões agudas (*bursts*) separadas por períodos de remissão. Se um ou ambos destes modelos são relevantes indica a necessidade de mais investigação, embora o “modelo burst” seja consistente com o envolvimento de neutrófilos na periodontite (32).

Juntamente com a barreira epitelial, a ação de fagócitos, do sistema do complemento, as células natural killer (NK) desempenham papel importante na linha de frente na defesa contra os antígenos (35).

A imunidade inata representa a resistência hereditária à infecção e demonstra notável especificidade de discriminação entre o hospedeiro e os agentes patogênicos por meio do sofisticado sistema baseado em TLRs. Os TLRs presentes nas células epiteliais gengivais são continuamente estimulados, resultando na produção de citocinas e defensinas que ajudam a manter a saúde bucal. Se a barreira epitelial torna-se violada, permitindo a invasão de bactérias no tecido conjuntivo subjacente, os TLRs em outras células residentes (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas) e não residentes do periodonto são ativados. Isto conduz a uma liberação exagerada de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores biológicos, os quais podem causar a destruição do tecido do hospedeiro (33,36).

Após a interação com os PAMPs, TLRs ativam as células imunológicas inatas por meio de vias de sinalização intracelular. Esta resposta imunológica inata mediada por TLRs também torna-se fundamental para a ativação da imunidade adaptativa (33). Mais recentemente, tem sido demonstrado que TLRs também são expressos em células responsáveis pela imunidade adaptativa, isto é, os linfócitos T e B (linfócitos T $\gamma\delta$  e B1). Os TLRs expressos em linfócitos T e os seus respectivos ligantes podem modular diretamente a função das células T (33).

Os TLRs envolvem a ativação da expressão de moléculas co-estimuladoras e produção de citocinas e quimiocinas, que são críticas para a proliferação e diferenciação de células T (33). Sabe-se atualmente que as células imunológicas liberam quantitativa e qualitativamente diferentes citocinas quando estimuladas por

bactérias Gram positivas e Gram negativas, o que indica a especificidade da resposta (33).

A regulação genética que leva à secreção de citocinas pró-inflamatórias de uma variedade de células é geralmente dependente da ativação do fator nuclear do fator de transcrição  $\kappa B$  / fator nuclear kappa beta (NF $\kappa B$ ). As vias regulatórias NF $\kappa B$  são ativadas por PAMPs tais como LPS por meio da via TLR (11).

Recentemente foi sugerido que a mucosa bucal desenvolve tolerância após exposição repetida a produtos bacterianos. A sub-regulação da expressão de TLRs e inibição da sinalização intracelular podem ser os mecanismos subjacentes à tolerância. No entanto, pesquisas recentes têm indicado que, em condições de homeostasia entre parasita e hospedeiro, a ativação de TLRs por bactérias comensais torna-se fundamental para a manutenção da saúde bucal. Células epiteliais gengivais expressam TLR 2, 3, 4, 5, 6 e 9 e reconhecem diversos micro-organismos com a ajuda destes receptores. Portanto, a sinalização dos TLRs limita a invasão microbiana e evita micro-organismos comensais violem a barreira epitelial, assim, mantendo a saúde gengival (33).

Os macrófagos, células fagocíticas da linhagem mielóide, ingerem eficientemente antígenos particulados e expressam moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II que induzem as células T. Os macrófagos são células amplamente distribuídas que desempenham um papel indispensável na homeostase e defesa. As células dendríticas também expressam moléculas do MHC classe II e têm atividade co-estimulatória. É evidente que os sistemas inato e adaptativo estão coordenadamente envolvidos na resposta inflamatória e destruição de tecidos, embora não haja uma completa compreensão do mecanismo de muitas doenças inflamatórias, incluindo periodontite, obesidade, diabetes, artrite reumatóide e DCV (11). Também as células B podem ser células apresentadoras de antígenos (APCs) (37).

Sabe-se que quando a lesão periodontal aguda persiste sem resolução, antígenos bacterianos são processados e apresentados ao sistema imunológico adaptativo por macrófagos e células dendríticas. Em termos gerais, os linfócitos T reconhecem células imunológicas apresentadoras de antígenos de patógenos intracelulares. Linfócitos B suportam a molécula imunoglobulina (Ig) na sua

superfície, que funciona como receptor de antígenos (macromoléculas não peptídicas, p. ex. lipídios). Os anticorpos, que são formas solúveis de Igs, são secretados após ativação de células B ao se ligarem a patógenos e material “não próprio” (pequenas moléculas químicas) nos espaços extracelulares (imunidade humoral). As células T são as células efetoras da imunidade mediada por células (hipersensibilidade tardia). O receptor de antígeno de células T é uma molécula ligada a membrana que reconhece fragmentos peptídicos de agentes patogênicos. A ativação do receptor de células T (TCR) requer o MHC. Duas classes de moléculas do MHC são necessárias para a ativação de distintas subpopulações de células T. Várias subpopulações de células T eliminam células alvo infectadas (MHC da classe I liga-se a linfócitos T CD8+) e ativam macrófagos (MHC da classe II liga-se a linfócitos T CD4+), células B e outras células T (11).

Recentemente, Gonzalez *et al.* (2014) (36), demonstraram, em tecidos gengivais de macacos *Rhesus*, um aumento da transcrição de genes relacionados com a classe II do MHC (endocitose de antígenos) e regulação negativa de células NK com o envelhecimento nos tecidos gengivais saudáveis. Em contraste, tecidos gengivais induzidos à periodontite apresentaram diminuição da transcrição de genes para expressão do MHC classe II, coincidentes com aumento da regulação de genes MHC classe I-associados que poderia refletir auto antígenos associados com o hospedeiro ou visando micro-organismos intracelulares citoplasmáticos.

Sabe-se que a linfangiogênese, o crescimento de novos vasos linfáticos da rede vascular pré-existente, ocorre durante o desenvolvimento da DP e os vasos linfáticos permanecem expandidos após o estabelecimento da periodontite crônica. Fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFs) são constantemente produzidos pelos queratinócitos na gengiva e VEGF-C foi abundantemente expresso em células imunológicas recrutadas, o que torna provável sua importância para a resposta linfangiogênica observada (38).

Após estimulação antigênica, as células T CD4+ *naïve* tornam-se ativadas, proliferam e diferenciam-se em subpopulações de células efetoras distintas caracterizadas por seus específicos perfis de produção de citocinas e específicas funções (31). Estas foram inicialmente subdivididas em duas subpopulações designadas Th1 e Th2. Células Th1 secretam IL-2 e IFN, IL-12, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ , e estão envolvidas na erradicação de agentes patogênicos intracelulares

(bactérias, protozoários e vírus) e têm sido implicadas na hipersensibilidade tardia e doenças inflamatórias, enquanto que as células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (11).

O papel importante das citocinas Th1 (IL-2 e IFN) caracteriza-se em aumentar as respostas mediadas por células, enquanto que o papel da citocina Th2 (IL-4) caracteriza-se em suprimir as respostas mediadas por células. Subpopulações de células T também são importantes no comportamento de células B. Por exemplo, as células Th1 afetam diretamente a secreção de IgG2 pelas células B, enquanto as células Th2 aumentam a secreção de IgG1 (11).

Células Th2 medeiam a imunidade humoral, incluindo a produção de IgE e ativação de mastócitos, que medeiam as respostas imunológicas para helmintos. Esta subpopulação está implicada em reações alérgicas. Ambos os tipos de células produzem IL-3, TNF- $\alpha$  e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), assim sabe-se que a secreção de algumas citocinas nem sempre é associada a apenas uma subpopulação de células Th (11).

As células T CD8<sup>+</sup> citolíticas são células imunológicas efetoras que também secretam citocinas de ambos os tipos Th1 ou Th2 (11).

Na resposta imunológica, a taxa de células T auxiliares / T citotóxicas (CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup>) é usada como um índice importante que determina o carácter desta (39).

Também, reações autoimunes são evidentes nas lesões periodontais pela produção de autoanticorpos contra componentes do tecido periodontal (colágeno, proteínas desmossomais, neutrófilos, fosfolípidios) (32,40-42).

Sabe-se que as respostas de células Th fornecem as citocinas necessárias para a proliferação de células B e a ativação policlonal dessas (facilitada pela presença de LPS), que conduzem a níveis elevados de anticorpos e a produção contínua de IL-1 $\beta$  a qual contribui para a reabsorção óssea (43,44).

O paradigma Th1/Th2, criado no final de 1980, elegantemente explicou muito sobre células T e imunidade, embora em muitos casos as doenças de etiologia imunológica tenham sido classificadas em uma categoria ou outra, muitas vezes sem evidência de suporte adequada. A descoberta da subpopulação Th17 foi solicitada a re-examinar o papel das células T em doenças inflamatórias (32).

Assim, outras duas subpopulações bem definidas de células T CD4<sup>+</sup>, Th17 e Tregs desempenham, quando ativadas, papéis antagônicos como células efectoras e supressoras respectivamente, e são ambas também importantes na resposta do hospedeiro e na patogênese da DP (11,32). O equilíbrio entre as células Th17 e Tregs é mantido pela diferenciação restrita e imunorregulação (18).

Recentemente, foram sugeridas as vias Th9 e Th22, mediadas pelas IL-9 e IL-22 respectivamente, em lesões periapicais estáveis, onde estas citocinas teriam papéis anti-inflamatórios protetores. A IL-9, inicialmente designada como uma citocina Th2, exerce atividades pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias pela modulação do desenvolvimento e função de células Tregs e/ou células Th17. A IL-22 também caracteriza-se como citocina pleiotrópica (45).

Células Th17 são assim nomeadas por terem como marca a produção de IL-17 (embora a IL-17 tenha também fontes celulares inatas) e atuarem contra bactérias e fungos extracelulares que foram fagocitados por APCs. As células Th17 também produzem IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-21, IL-22, IL-23, IL-26 e ligante do receptor ativador de fator nuclear kappa beta (RANKL) (11,32). A expansão das células Th17 humanas é regulada pela IL-23, enquanto que a IL-1, TGF- $\beta$ 1 e IL-6 iniciam a diferenciação de Th17 (46).

Também, a IL-21, como fator regulador autócrino de células Th17, desempenha importante papel na indução da diferenciação de células Th17 e na inibição da função Th1 e Tregs (18).

A caracterização funcional de três novos membros da superfamília TNF (ligante e receptor): RANKL, seu receptor RANK e o receptor solúvel de RANKL, a osteoprotegerina (OPG), tem contribuído significativamente para o estabelecimento da osteoimunologia e da participação como moduladores chave da fisiologia e patologia da reabsorção óssea.

O RANKL exerce seus efeitos biológicos por meio da indução à diferenciação de osteoclastos, a maturação e ativação e inibição da apoptose (31). O RANKL na presença do fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) se liga ao RANK presente em osteoclastos e precursores de osteoclastos (OCP) e os ativam. Também, muitos fatores osteotrópicos bem conhecidos, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6

e IL-17, exercem as suas atividades osteoclastogênicas pela indução da expressão de RANKL em osteoblastos e células T CD4<sup>+</sup> (31).

Por conseguinte, osteoblastos, células T e B, e fibroblastos expressam o RANKL. Os osteoblastos expressam TLR1, 2, 4, e 6 e respondem aos ligantes TLR2/6 e TLR2/1, aumentando os níveis de ativação de NFκB e expressão de RANKL. O chamado fator de proteção óssea, OPG, produzido pelos osteoblastos e células estromais da medula óssea, por exemplo, fibroblastos residentes no periodonto e células endoteliais, inibe a interação RANK/RANKL e previne a reabsorção óssea (33,47,48).

Também, a proteína inflamatória quimiotática para macrófagos (MIP)-3 alfa é crucial para a quimiotaxia e manutenção de células imunológicas e, especialmente, células Th17 em tecidos inflamados. Um papel quimiotático de fibroblastos do ligamento periodontal para atrair células Th17 no periodonto inflamado provavelmente ocorre por meio da regulação positiva da MIP-3 alfa (46).

Dessa forma, os linfócitos Th17 influenciam na lesão tecidual mediada por células, uma vez que podem ser sede de proteção por meio da mobilização de neutrófilos e expressão de fatores antimicrobianos. Porém, inversamente, colaboram na patogênese da doença inflamatória autoimune, por exemplo, provocando a osteoclastogênese (IL-17 e RANKL) (46).

Células Th17 são observadas em sítios com CP e citocinas Th17 relacionadas são produzidas em lesões periodontais (11,32).

Também, estudos recentes abordaram que a bactéria *Pg* caracteriza-se como manipuladora da resposta do hospedeiro, em vez de uma indutora potente de inflamação, ou seja, esta possui atividade normalmente associada com uma bactéria envolvida em uma doença inflamatória. Especificamente, ao subverter a sinalização imunológica inata, incluindo a interferência entre complemento e TLRs, *Pg* pode prejudicar as defesas do hospedeiro de forma que são alterados o crescimento e desenvolvimento de toda a comunidade microbiana. Dessa forma, provoca uma mudança destrutiva na relação homeostática com o hospedeiro. Além disso, sugere-se que a *Pg* pode modificar a resposta imunológica adaptativa. A interação de *Pg* com células dendríticas induz a um padrão de citocinas que favorece à polarização de células Th17 à custa da linhagem Th1. Também, *Pg* inibe a produção de



quimiocinas pelas células epiteliais gengivais que recrutam células Th1, bem como a produção de IFN- $\gamma$  por células T. Por conseguinte, poderia-se supor que *Pg*, ao favorecer a inflamação mediada por Th17 e na ausência da efetividade de células Th1, que atuam na imunidade celular mediada, tem sua depuração imunológica prejudicada (32).

Em resumo, os mecanismos inflamatórios que levam à perda óssea na periodontite referem-se aos neutrófilos recrutados para o sulco gengival/bolsa periodontal que, por sua vez, não conseguem controlar o desequilíbrio na relativa abundância de espécies microbianas dentro do ecossistema. Invadem, assim o tecido conjuntivo e interagem com outros tipos de células do sistema imunológico, tais como os macrófagos, as células dendríticas e células T  $\gamma\delta$ , uma subpopulação de linfócitos “ínatos-semelhantes”. Estas células produzem mediadores pró-inflamatórios, tais como as citocinas que desencadeiam a reabsorção óssea como TNF, IL-1 $\beta$  e IL-17, e também regulam o desenvolvimento de células Th, o que também contribuirá para a resposta inflamatória e sua exacerbação. A IL-17 atua sobre células do sistema inato e adaptativo e células do tecido conjuntivo, tais como neutrófilos, fibroblastos e osteoblastos. Por meio dessas interações, a IL-17 induz a produção de quimiocinas CXC (cisteína-aminoácido-cisteína) que recrutam neutrófilos, metaloproteinases da matriz (MMP) e outras moléculas relacionadas à destruição de tecidos, por exemplo, espécies de oxigênio reativo (ROS), bem como a expressão de RANKL em osteoblastos, o que leva à maturação dos OCP. Linfócitos ativados (células B e T, especificamente do tipo Th1 e Th17) desempenham papel importante na reabsorção óssea patológica pelo mesmo mecanismo dependente de RANKL, ao passo que a OPG é um receptor chamariz solúvel que inibe a interação de RANKL com o seu receptor funcional RANK em OCP. A razão RANKL/OPG aumenta com o aumento da atividade inflamatória, já que a OPG encontra-se regulada negativamente. Os neutrófilos ativados expressam RANKL ligado à membrana e podem estimular diretamente à osteoclastogênese se os mesmos estiverem próximos o suficiente do osso. A citocina anti-inflamatória IL-10 produzida por células Tregs, assim como, IFN- $\gamma$  produzido por células Th1, e IL-4 e IL-13 produzidas por células Th2 podem suprimir a osteoclastogênese. No entanto, ressalta-se que a interação das células da imunidade inata e adaptativa é consideravelmente mais complexa, embora estes principais mecanismos destrutivos

operem no contexto da não erradicada infecção periodontal e inflamação (32).

Recentemente, foram elaboradas importantes hipóteses em relação ao papel fisiopatológico da IL-33 na DP. A IL-33 é um membro recentemente descoberto da família IL-1. As células endoteliais e epiteliais produzem constitutivamente essa citocina. A IL-33 é o ligante do receptor ST2, um membro da superfamília TLR/IL-1R. Esta provavelmente desempenha três funções em relação à DP: como um alarme, um quimioatraente e uma citocina sistêmica. A liberação de IL-33, quando atua como um alarme, resulta na destruição de diversas células por necrose, principalmente fibroblastos e células epiteliais. No contexto da doença inflamatória, a IL-33 induz outras respostas: degranulação dos mastócitos e a produção de células pró-inflamatórias (por exemplo, macrófagos, eosinófilos e basófilos). A liberação de mediadores inflamatórios e de IL-33 irá induzir a ativação de osteoblastos, o que leva à produção de RANKL e diminui a produção de OPG, e a subsequente ativação de osteoclastos, aumentando fatores de transcrição de osteoclastos. Além disso, a degranulação de mastócitos em adição ao estado de inflamação irá produzir sensibilização dos monócitos circulantes e, neste microambiente, esses vão diferenciar-se em osteoclastos (49).

Além disso, o papel da resposta de células B e plasmócitos não é totalmente compreendido na periodontite, embora se considere que a resposta do anticorpo não seja protetora. De fato, o aumento da deposição de complexos imunológicos, juntamente com fragmentos do complemento na gengiva doente sugerem que os anticorpos secretados de plasmócitos podem estar envolvidos na resposta inflamatória. Também, a capacidade das células B para a produção de citocinas inflamatórias e MMPs pode contribuir ainda mais para a lesão do tecido. Talvez mais importante, as células B constituem, juntamente com as células T, a maior fonte de RANKL secretados e ligados à membrana, nas lesões de reabsorções ósseas da periodontite. O papel protetor postulado das células Th1 torna-se consistente com a correlação negativa de citocinas relacionadas com o tipo Th1 (IFN $\gamma$  e IL-12) com a gravidade da periodontite em alguns estudos, e a capacidade das mesmas citocinas para promover a imunidade mediada por células e para inibir a osteoclastogênese. No entanto, outros estudos têm atribuído efeitos destrutivos para as células Th1 e IFN $\gamma$  na periodontite, de acordo com a capacidade das células Th1 ativadas para também expressar RANKL. Tais discrepâncias, portanto, podem, em parte, ser

atribuídas a papéis opostos desempenhados pela mesma subpopulação de células T na periodontite. No mesmo sentido, as células Th2, que promovem respostas destrutivas de células B, podem também secretar IL-4 e IL-13, que podem inibir a osteoclastogênese (32).

Assim, a dissecação da resposta periodontal do hospedeiro, em termos de aspectos de proteção e destrutivos, parece ser confundida pela própria natureza da doença, em que uma resposta antimicrobiana protetora potente pode ser compensada por danos teciduais inflamatórios colaterais. Isto se torna, possivelmente, também verdadeiro para outras doenças inflamatórias com etiologia polimicrobiana complexa. Atualmente, por conseguinte, não é possível atribuir funções definidas para subpopulações de células T efectoras na periodontite (32).

É provável que diferentes subpopulações de células T predominem em diferentes fases da DP e a incapacidade para determinar a atividade da doença clinicamente torna-se uma limitação importante, em todos os estudos (50).

#### 2.1.1.1 Resposta Local e Sistêmica da Doença Periodontal

Em células creviculares diferenças significativas foram estabelecidas entre os pacientes com AgP, CP e controles em relação à média do número de linfócitos T citotóxicos - CD8+ (LAgP > CP e controles) e linfócitos B - CD20+ (LAgP / GAgP > CP e LAgP / GAgP > controles). Foram observadas variações significativas na taxa de linfócitos T auxiliares CD4+ / CD8+ (LAgP < controles e GAgP < controles), bem como uma correlação entre o número de células T e o grau de inflamação. Isto suporta a hipótese de uma patogênese imunoinflamatória alterada em pacientes com AgP (51).

Também, amostras de biópsias gengivais de pacientes com CP foram principalmente dominadas por células T CD4+ e CD8+. Contrariamente, nos pacientes com AgP todos os quatro tipos de células (CD4+, CD8+, CD20+

[plasmócitos] e CD68+ [macrófagos]) foram notavelmente aumentadas. Células CD20+ foram significativamente mais prevalentes na AgP do que na CP (52).

Já, em relação à resposta sistêmica, o soro fornece informações sobre o estímulo inflamatório e resposta gerada na circulação frente aos patógenos periodontais (53).

Os níveis séricos de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 foram significativamente aumentados, enquanto que os de IL-2 foram significativamente menores nos pacientes com periodontite em comparação com controles saudáveis. Aumento dos níveis séricos de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em pacientes com periodontite foi associado com o aumento no biofilme dentário de *Aa* e *Pg*, respectivamente. Também, a presença de *Aa* e *Treponema denticola* foi associada com um aumento da população de CD3-/CD16+ e células CD3+/CD8+, respectivamente (54).

Além disso, a resposta imunológica humoral a bactérias torna-se estimulada em pacientes com DP, como determinado por anticorpos IgG no soro a bactérias específicas e/ou seus antígenos (55).

Embora alguns estudos tenham demonstrado que formas graves de DP apresentem perfis inflamatórios sistêmicos semelhantes (56-58), Lima *et al.* (2011) (59), encontraram fontes celulares distintas de citocinas imunorregulatórias em pacientes com AgP em relação a pacientes com CP, em que a frequência de IL-10 de células que expressam CD14+ foi maior na CP, mas não na AgP, em comparação com controles saudáveis. A quantidade de células T CD4+ envolvida na produção de IL-4 foi maior na CP do que em controles saudáveis.

Também, Nowak *et al.* (2013) (60) encontraram uma distinção biológica entre os dois tipos da periodontite (AgP e CP), especialmente quanto à produção de IFN e ativação de células NK, em que uma infiltração de células NK tipo Th1 acentuada em lesões periodontais agressivas associadas ao *Aa* foi observada.

A evidência de que a periodontite constitui um fator infeccioso e inflamatório capaz de aumentar a síntese de mediadores inflamatórios provém também da relevante contribuição que os estudos envolvendo terapia periodontal têm proporcionado.

O efeito da terapia periodontal não cirúrgica demonstrou níveis de IL-17 e IL-

21 diminuídos e de IL-4 aumentados no fluido gengival, no entanto não foram observadas diferenças no nível de IFN- $\gamma$ . De modo correspondente, a expressão de fatores de transcrição como RORC (Th17) diminuiu 1,99 vezes e de GATA-3 (Th2) foi aumentada em 1,76 vezes no sangue periférico. Novamente, não houve diferenças no nível de T-bet (Th1). Além disso, a quantidade de células Th17 no sangue periférico foi reduzida, em especial a subpopulação IL-17+, IFN- $\gamma$ +. Estes resultados sugeriram que as células Th17 desempenham um papel destrutivo no equilíbrio imunológico da periodontite e o efeito das células Th1 não se tornou significativo, enquanto que as células Th2 tiveram um efeito protetor (18). Também, uma diminuição significativa nas concentrações séricas de IL-17 seis meses pós-terapia foi encontrada (61).

Além disso, sabe-se que indivíduos com melhor resposta à terapia periodontal tiveram diminuída sua categoria de risco inflamatório (OR 4,8, 95% CI 1,4-15,8), após correção para idade, gênero, etnia e tabagismo (62).

Cabe ressaltar que a eficácia claramente estabelecida da terapia periodontal sobre a resolução da inflamação e cura dos tecidos periodontais envolve a modificação da microbiota, com recolonização de bactérias comensais e restabelecimento da homeostasia. Isto significa, entre outros benefícios, baixa na produção de mediadores inflamatórios e, conseqüentemente, pouco ou nenhum alcance sistêmico dos mesmos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

- Avaliar os efeitos sistêmicos da terapia periodontal não cirúrgica na contagem de leucócitos e níveis de fator de crescimento transformador – beta no sangue periférico.

##### **3.1.1 Objetivos Específicos**

- Avaliar a correlação entre os níveis de TGF- $\beta$  e leucometria no sangue periférico e os diferentes tipos de periodontite grave (periodontite agressiva localizada; periodontite agressiva generalizada; periodontite crônica generalizada) e os efeitos da terapia periodontal mecânica sobre tais níveis.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 INDIVÍDUOS E GRUPOS DE ESTUDO

O protocolo desse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília (045/2008 – ANEXO A). O ensaio clínico foi registrado no <http://www.clinicaltrials.gov.br/>, No. RBR-24T799.

A fase clínica deste estudo foi conduzida na Clínica de Periodontia do Curso de Odontologia da Universidade de Brasília (UnB) e as fases laboratoriais, hemograma com contagem diferencial para leucócitos e quantificação dos níveis séricos de TGF- $\beta$ , no Hospital Universitário de Brasília, Laboratório Hematológico – HUB e Laboratório de Imunologia Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – IBCCF-UFRJ, respectivamente. A avaliação e seleção da amostra ocorreram entre agosto de 2008 e agosto de 2010. O total da amostra (amostra de conveniência) compreendeu 55 indivíduos sistemicamente saudáveis. Todos os pacientes eram não fumantes e não usavam qualquer medicação. O grupo periodontite consistiu de 19 mulheres (68%) e nove homens (amplitude de idade de 20-45; idade média:  $34,36 \pm 6,24$ ), com a presença de pelo menos 18 dentes. A classificação da DP foi de acordo com Armitage (1999) (63) e Armitage e Cullinan (2010) (34). O grupo controle consistiu de 18 mulheres (67%) e nove homens (amplitude de idade de 21-44; idade média:  $33,18 \pm 6,42$ ), com profundidade de sondagem clínica (PS)  $\leq 3$  mm e nível de inserção clínica (NIC)  $\leq 3$  mm,  $\leq 10\%$  dos sítios com SAS e não evidência radiográfica de perda óssea (Figura 1). Os critérios

de exclusão foram os seguintes: história positiva de tabagismo; gestantes ou lactantes; terapia periodontal anterior; terapia antimicrobiana para condições sistêmicas ou uso de antimicrobianos orais tópicos nos últimos doze meses; diabetes; doença autoimune; infecções agudas; alergias graves; doenças gastrointestinais e renais; cancer; obesidade mórbida ( $\text{IMC} > 40 \text{ kg/m}^2$ ) ou abaixo do peso (mal nutridos  $\text{IMC} < 18,5 \text{ kg/m}^2$ ) (64), ou qualquer condição que os investigadores julgaram poder alterar a função do sistema imunológico, incluindo o uso de medicações imunossupressivas, tais como terapia com corticóides, que pode alterar o nível de mediadores inflamatórios. Todos os indivíduos foram informados verbalmente e por escrito do objetivo do estudo e, ao concordarem com as implicações do tratamento, foram convidados a assinarem o termo de consentimento Livre e Esclarecido.



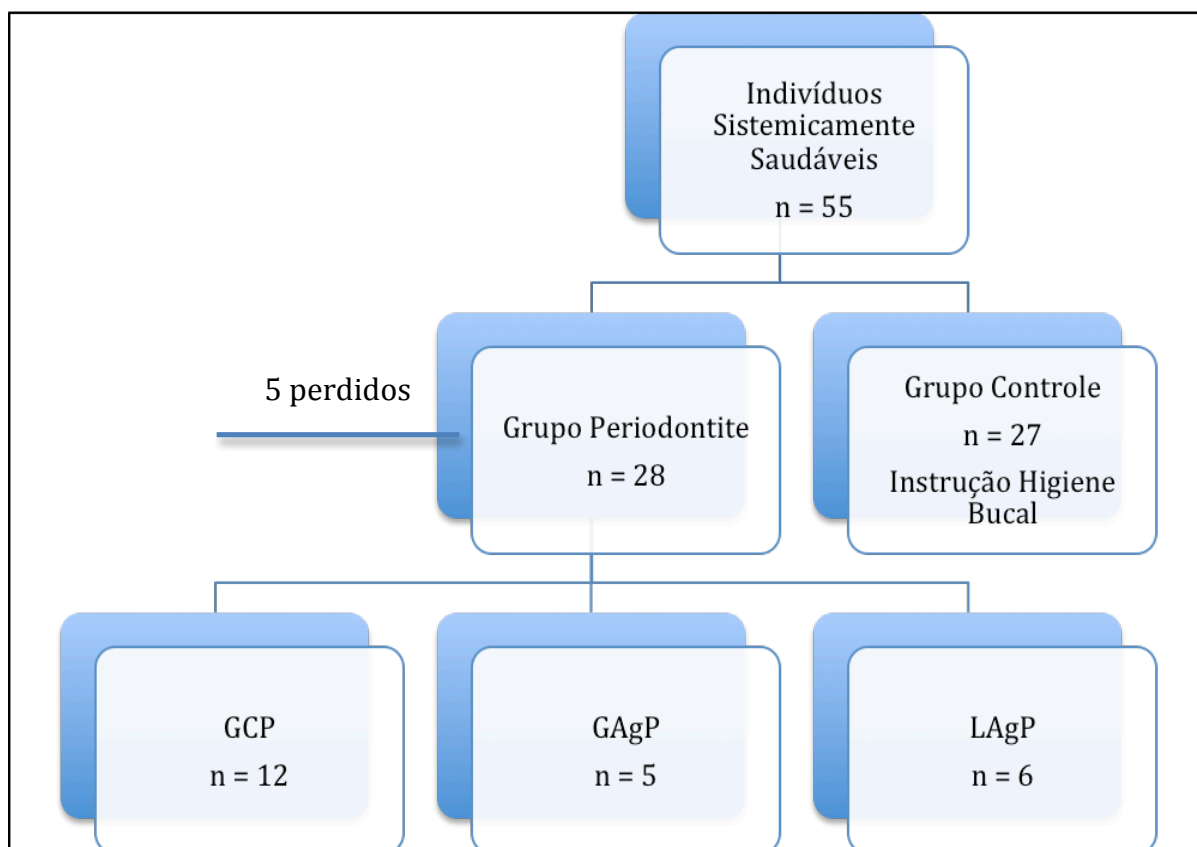


Figura 1. Flowchart delineamento do estudo

#### 4.1.1 Exame Clínico

O exame clínico, realizado por um único examinador experiente, incluiu o registro de placa bacteriana visível (IP) (65), sem o uso de qualquer corante, PS, SAS (65) e NIC. As mensurações foram registradas em quatro sítios ao redor de cada dente, vestibular, lingual e sítios proximais (para cada superfície proximal a maior profundidade foi considerada), com o uso de sonda manual (sonda Michigan O com marcações de Williams), excluindo terceiros molares. A calibração e medidas de PS e NIC foram repetidas dentro de 24 horas e demonstraram concordância acima de 80%. O SAS foi calculado pelo coeficiente de Kappa e a concordância

intra-examinador foi  $>0,85$ . O exame clínico foi realizado no momento inicial e no fim do período de seis meses da terapia de manutenção.

#### 4.1.1.1 Protocolo de Tratamento e Análise Laboratorial

Os indivíduos do grupo periodontite foram tratados em três estágios: 1- terapia periodontal mecânica (raspagem e alisamento radicular) com curetas Gracey (5/6, 7/8, 11/12 e 13/14), 2- reinstrumentação de sítios, 3- terapia periodontal de suporte (SPT). O estágio 1 foi realizado em  $\leq 14$  dias. Um mês após, no estágio 2, realizou-se nova instrumentação mecânica nos pacientes em que persistiam bolsas profundas, sangramento à sondagem e cálculo. Nesse estágio, fez-se raspagem e alisamento radicular meticulosa até o alcance das seguintes condições periodontais pré-determinadas: profundidade de sondagem acima de 4 mm em apenas três ou menos sítios, profundidade de sondagem acima de 5 mm em dois sítios no máximo, índice de placa  $\leq 15\%$  e sangramento à sondagem  $\leq 10\%$ . No estágio 3, os indivíduos foram agendados, quinzena ou mensalmente, de acordo com a necessidade de controle de formação de biofilme dentário. A terapia periodontal de suporte foi realizada por seis meses (Figura 2). Os indivíduos do grupo controle receberam instrução de higiene bucal no momento inicial.

Dos 28 indivíduos do grupo periodontite, quatorze foram diagnosticados como GCP, oito como GAgP e seis como LAgP. Cinco indivíduos com periodontite não completaram o tratamento e o seguimento: doze com GCP, cinco com GAgP e seis com LAgP. Vinte e três indivíduos concluíram os três estágios do protocolo periodontal. Entre os 23 indivíduos que completaram o tratamento periodontal, dez (43%) completaram em nove meses, dez (43%) em dez meses e três (14%) em doze meses. Nenhum dos pacientes com periodontite reportou efeitos adversos do tratamento tais como febre ou indisposição.

As amostras de sangue foram coletadas para análise bioquímica no momento inicial para todos os 28 indivíduos do grupo periodontite e 27 indivíduos do grupo controle. Novas amostras de sangue foram coletadas dos 23 indivíduos do grupo periodontite que completaram o tratamento periodontal, nos respectivos períodos após o início do tratamento: nove meses (dez indivíduos), dez meses (dez indivíduos) e doze meses (três indivíduos). O sangue venoso em jejum foi coletado em tubos de gel separador entre 7:00 e 8:00 horas. Cada tubo EDTA foi analisado dentro de três horas no laboratório hematológico do Hospital Universitário da Universidade de Brasília (HUB) para hemograma com contagem diferencial para leucócitos, que incluiu mensurações padrão do número de neutrófilos, linfócitos, monócitos, basófilos e eosinófilos. Amostras de soro e plasma foram imediatamente colocadas no gelo e estocadas em -80°C.

A análise laboratorial também constou da reação de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay* – ensaio imunoenzimático) que foi utilizada para quantificação dos níveis sorológicos de TGF- $\beta$ , de acordo com as instruções do fabricante por meio de kits comercialmente disponíveis (R&D Systems, Abingdon, UK) com limite de detecção de 9,375 pg/mL. Em resumo, placas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais humanos (anticorpos de captura) para o alvo. Após o bloqueio por duas horas, a fim de evitar a ligação não específica, TGF- $\beta$  recombinante humana ou amostras coletadas de soro dos pacientes desta pesquisa foram adicionadas. A citocina foi detectada após a ligação dos anticorpos de detecção (biotinilados) depois da ligação da enzima estreptavidina em cada poço. A microplaca foi lavada para remover anticorpos não ligados com a enzima. A reação colorimétrica resultante da adição do substrato foi parada pela adição de ácido sulfúrico 1 M e as placas foram lidas a 492 nm por um leitor de microplacas (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). As concentrações de TGF- $\beta$  em cada amostra foram determinadas por interpolação de uma curva padrão e foram apresentadas como pg/mL (média  $\pm$  desvio padrão). Os níveis séricos de IL-6 foram também investigados, mas não foram detectáveis nas amostras.

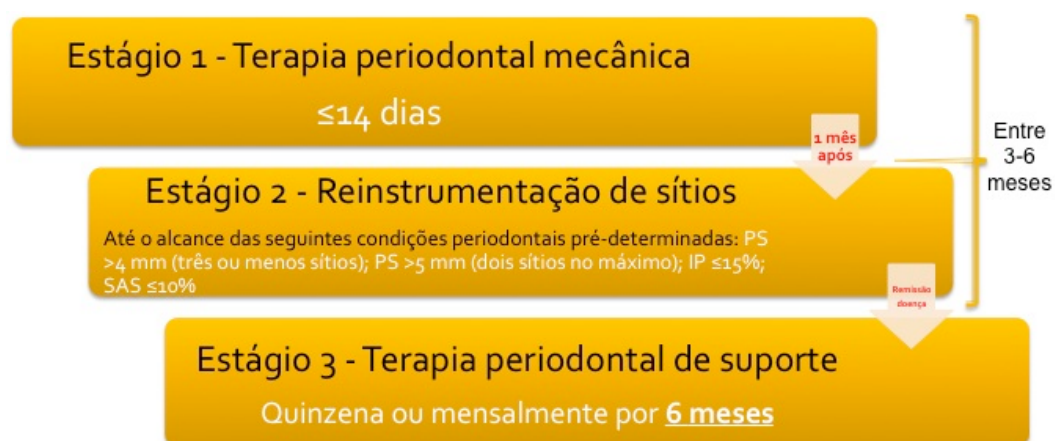


Figura 2 – Protocolo de tratamento (Grupo periodontite)

#### 4.1.1.1.1 Análise Estatística

As características demográficas, parâmetros clínicos bucais/periodontais e hematológicos (hemograma com contagem diferencial para leucócitos) iniciais e após a terapia periodontal de suporte, para ambos os grupos periodontite e controle saudável, foram apresentados em média  $\pm$  desvio padrão (SD). Os parâmetros clínicos periodontais IP, PS menor ou igual a 3 mm, PS 5 e 6 mm e SAS iniciais e após a terapia periodontal no grupo periodontite foram comparados pelo teste t Student emparelhado por apresentarem distribuição gaussiana, como também as células linfócitos, monócitos, neutrófilos, leucócitos totais. Nos dois momentos avaliados para este grupo, o teste não paramétrico de Wilcoxon foi empregado quando as variáveis número de dentes (ND), PS 4 mm e maior ou igual a 7 mm, eosinófilos e basófilos não apresentaram normalidade. As medidas ND, IP, SAS e parâmetros hematológicos, quando comparados entre o grupo controle e periodontite, antes ou pós-terapia, foram confrontados pelo teste t Student para as variáveis que apresentaram distribuição gaussiana em ambos os grupos. Nos casos em que não se observou a normalidade nos dois grupos foi empregado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os dados foram analisados por meio do programa

SAS 9.2 para Windows. Para efeito de análise foi empregado um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

Para evitar interferência da classificação da DP na interpretação dos resultados foram feitas comparações dos valores médios das variáveis estudadas, no pós-tratamento, entre os três tipos de DP do grupo periodontite (GCP, GAgP, LAgP). Dessa forma, comparações de todas as medidas testadas, anteriormente citadas, foram feitas com o uso do modelo de análise de covariância (ANCOVA). Considerou-se como variável dependente o valor da medida no pós-tratamento e, como variável auxiliar o valor da medida no momento inicial. Ajustamento de Tukey foi empregado para se ajustar três comparações múltiplas e contrastes pré-especificados foram usados para testar três hipóteses: primeira, os valores médios no subgrupo GAgP não diferem estatisticamente dos valores médios no subgrupo LAgP; segundo, os valores médios no subgrupo GAgP não diferem estatisticamente dos valores médios no subgrupo GCP; e terceiro, os valores médios no subgrupo LAgP não diferem estatisticamente dos valores médios no subgrupo GCP. Para a variável idade, foram feitas comparações dos valores médios após a terapia entre os três grupos com o uso do modelo de análise de variância (ANOVA). Ajustamento de Tukey foi empregado para se ajustar três comparações múltiplas, e contrastes pré-especificados foram usados para testar as mesmas três hipóteses citadas anteriormente. A comparação da proporção de indivíduos do gênero masculino, como também do gênero feminino, entre os grupos foi testada por meio do teste de Qui quadrado.

Para finalizar, os dados sorológicos, pré e pós-terapia, referentes à quantificação de TGF- $\beta$  por ELISA foram analisados por meio do teste ANOVA a um critério seguido de pós-teste de Tukey no programa GraphPad Prism (v5.0). Para efeito de análise foi empregado um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E CLÍNICOS BUCAIS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO PRÉ E PÓS-TERAPIA PERIODONTAL NÃO CIRÚRGICA

Inicialmente, foram envolvidos no estudo, 28 pacientes sem doenças sistêmicas, não fumantes e com DP (idade média:  $34,36 \pm 6,24$ ; 32% homens) e 27 controles saudáveis (idade média:  $33,18 \pm 6,42$ ; 33% homens). Não houve diferença entre grupo periodontite e controle para as variáveis idade ( $p = 0,4955$ ) e gênero ( $p = 0,9251$ ). Do total de pacientes do grupo periodontite, 23 foram acompanhados até a remissão da DP e mantidos na terapia periodontal de suporte. Os parâmetros clínicos bucais iniciais e após a terapia periodontal de suporte estão mostrados na Tabela 1.

No grupo periodontite, os valores médios após a SPT para as medidas ND, IP, SAS e PS igual a 4 mm, 5-6 mm e  $\geq 7$  mm foram estatisticamente menores que os valores médios para as mesmas medidas antes da terapia periodontal. O valor médio após a SPT para a medida PS  $\leq 3$  mm foi estatisticamente maior que o valor médio antes da terapia. A terapia periodontal levou a um significativo decréscimo em todos os parâmetros clínicos. A diferença intragrupo entre o momento inicial e após a SPT teve  $P$  valor de 0,0001 para o ND e  $P$  valor  $< 0,0001$  para todos os outros parâmetros clínicos. Não foi possível aplicar testes estatísticos para a medida NIC, pois este parâmetro clínico foi mensurado apenas anteriormente à terapia periodontal.

O grupo controle foi significativamente diferente no momento inicial do grupo periodontite ( $p < 0,0001$  para IP e SAS). Os valores médios dessas medidas para o grupo periodontite antes da terapia foram estatisticamente maiores em relação aos valores médios para as mesmas medidas no grupo controle. Nos controles, o valor

médio da medida ND não diferiu estatisticamente do valor médio para a mesma medida quando comparada ao grupo periodontite antes da terapia.

A partir das comparações entre o grupo controle e grupo periodontite após terapia obteve-se os seguintes resultados: o valor médio da medida IP para o grupo periodontite não diferiu estatisticamente do valor médio para a mesma medida quando comparada ao grupo controle; o valor médio para o IP no grupo periodontite foi bastante reduzido em relação a esse mesmo valor antes da terapia. Adicionalmente, aproximou-se muito do valor médio para essa mesma medida no grupo controle. O valor médio da medida ND para o grupo periodontite foi estatisticamente menor em relação ao valor médio para a mesma medida no grupo controle. O valor médio para a medida SAS no grupo periodontite foi estatisticamente significativo e menor do que o valor médio para o SAS no grupo controle ( $p < 0,0001$ ).

Tabela 1 – Parâmetros clínicos bucais pré e pós-terapia periodontal de suporte.

Parâmetros *	Controle (n =27)	Pré-terapia (n =28)	Pós- terapia (n =23)	p valor pré x pós	p valor controle x pré	p valor controle x pós
ND	28,78±2,01	27,25±4,84	24,70±5,79	<b>0,0001<sup>1</sup></b>	0,5317 <sup>3</sup>	<b>0,0294<sup>3</sup></b>
IP (%)	4,74±2,30	63,61±33,64	4,83±6,73	<b>&lt;0,0001<sup>2</sup></b>	<b>&lt;0,0001<sup>3</sup></b>	0,0679 <sup>3</sup>
SAS (%)	2,67±1,49	44,46±29,35	1,63±3,35	<b>&lt;0,0001<sup>2</sup></b>	<b>&lt;0,0001<sup>3</sup></b>	<b>&lt;0,0001<sup>3</sup></b>
PS (mm)						
≤3 mm	100,00±0,00	68,71±14,38	98,32±1,79	<b>&lt;0,0001<sup>2</sup></b>	NA	NA
4 mm	0,00±0,00	4,02±4,02	0,63±0,96	<b>&lt;0,0001<sup>1</sup></b>	NA	NA
5-6 mm	0,00±0,00	17,08±8,85	0,85±1,22	<b>&lt;0,0001<sup>2</sup></b>	NA	NA
≥7 mm	0,00±0,00	10,45±8,89	0,17±0,61	<b>&lt;0,0001<sup>1</sup></b>	NA	NA
NIC (mm)						
≤3 mm	100,00±0,00	62,56±18,20	NA	NA	NA	NA
4 mm	0,00±0,00	4,97±4,77	NA	NA	NA	NA
5-6 mm	0,00±0,00	18,74±8,96	NA	NA	NA	NA
≥7 mm	0,00±0,00	13,73±11,49	NA	NA	NA	NA

\* Resultados apresentados em média ± desvio-padrão.

<sup>1</sup> Teste de Wilcoxon; <sup>2</sup> Teste t emparelhado; <sup>3</sup> Teste de Mann-Whitney; NA – não aplicável.

Como mostrado na Tabela 2, não existiram diferenças nos parâmetros hematológicos entre o grupo controle e grupo periodontite, tanto antes como após SPT.

Comparações intragrupo nos pacientes com periodontite, mostraram que os valores médios pós-terapia para as medidas eosinófilos, basófilos, linfócitos, monócitos, neutrófilos e leucócitos totais não diferiram estatisticamente daqueles registrados antes da terapia.

Tabela 2 – Parâmetros hematológicos pré e pós-terapia periodontal de suporte.						
Parâmetros *	Controle (n =27)	Pré-terapia (n =28)	Pós- terapia (n =23)	p valor pré x pós	p valor controle x pré	p valor controle x pós
Eosinófilos (mm <sup>3</sup> ) referências: 45 a 400	143,74±102,00	227,96±179,80	178,26±95,26	0,1666 <sup>1</sup>	0,0549 <sup>3</sup>	0,2548 <sup>3</sup>
Basófilos (mm <sup>3</sup> ) referências: 0 a 100	14,19±31,35	8,71±21,97	13,30±21,30	0,2188 <sup>1</sup>	0,5765 <sup>3</sup>	0,6033 <sup>3</sup>
Linfócitos (mm <sup>3</sup> ) referências: 900 a 3300	2238,52±520,45	2136,75±508,12	2075,22±550,65	0,3018 <sup>2</sup>	0,4663 <sup>4</sup>	0,2870 <sup>4</sup>
Monócitos (mm <sup>3</sup> ) referências: 90 a 800	428,22±141,26	368,75±128,59	366,65±138,50	0,5187 <sup>2</sup>	0,1082 <sup>4</sup>	0,1277 <sup>4</sup>
Neutrófilos (mm <sup>3</sup> ) referências: 2295 a 6500	3208,56±865,86	3548,64±1279,78	3104,59±1496,55	0,0871 <sup>2</sup>	0,3279 <sup>4</sup>	0,8049 <sup>4</sup>
Leucócitos totais (mm <sup>3</sup> ) referências: 4500 a 10000	6171,48±1260,51	6297,50±1515,88	5970,00±1734,72	0,1808 <sup>2</sup>	0,7393 <sup>4</sup>	0,6373 <sup>4</sup>

\* Resultados apresentados em média ± desvio-padrão.

<sup>1</sup> Teste de Wilcoxon; <sup>2</sup> Teste t emparelhado; <sup>3</sup> Teste de Mann-Whitney; <sup>4</sup> Teste t.



Entre os 23 indivíduos que completaram o tratamento periodontal, doze apresentavam GCP (oito mulheres e quatro homens; idade média:  $37,17 \pm 1,63$ ), cinco, GAgP (quatro mulheres e um homem; idade média:  $31,60 \pm 2,53$ ) e seis, LAgP (quatro mulheres e dois homens; idade média:  $30,67 \pm 2,31$ ). Os valores médios para a idade, como também a proporção de indivíduos do gênero masculino e feminino, no grupo periodontite, após terapia, não diferiram entre os três subgrupos de DP ( $p = 0,553$ ;  $p = 0,8485$ ; respectivamente). Uma vez que o grupo periodontite, neste estudo, constou de três subgrupos de DP grave, foram feitas comparações dos valores médios, no pós-tratamento, entre estes subgrupos para as medidas anteriormente citadas (Tabelas 3 e 4). Do ajuste dos modelos, foi observado que os valores médios das diversas medidas, exceto células linfócitos, não diferiram estatisticamente entre os três subgrupos de periodontite grave (GCP; GAgP; LAgP). No entanto, o valor médio correspondente às células linfócitos, no subgrupo LAgP, foi estatisticamente maior que o valor médio no subgrupo GCP ( $p < 0,0357$ ) e não houve diferença estatisticamente significativa entre os outros subgrupos. Os valores médios para as células linfócitos nos três subgrupos, em ordem decrescente, foram LAgP > GCP > GAgP.

Tabela 3 – Parâmetros clínicos bucais pré e pós-terapia periodontal de suporte nos subgrupos de periodontite.							
	Subgrupos Periodontite Grave*			p-valores			
Variáveis	Periodontite Agressiva Generalizada (GAgP)	Periodontite Agressiva Localizada (LAgP)	Periodontite Crônica Generalizada (GCP)	Comparação entre os Subgrupos – Teste F <sup>†</sup>	GAgP vs LAgP <sup>§</sup>	GAgP vs GCP <sup>§</sup>	LAgP vs GCP <sup>§</sup>
ND	22,81 ± 1,09	24,79 ± 1,01	25,43 ± 0,72	0,1722	0,3736	0,1551	0,8729
IP (%)	9,71 ± 2,18	3,26 ± 2,02	3,57 ± 1,41	0,0624	0,1035	0,0701	0,9916
SAS (%)	3,22 ± 1,26	1,61 ± 1,16	0,98 ± 0,77	0,3304	0,6541	0,3012	0,8946
PS (mm)							
≤3 mm	98,16 ± 0,77	98,66 ± 0,75	98,21 ± 0,47	0,8742	0,9029	0,9984	0,8702
4 mm	0,89 ± 0,45	0,43 ± 0,42	0,63 ± 0,29	0,7568	0,7364	0,8791	0,9204
5-6 mm	1,63 ± 0,54	0,07 ± 0,53	0,91 ± 0,35	0,1719	0,1480	0,5138	0,4220
≥7 mm	0,06 ± 0,30	-0,05 ± 0,27	0,33 ± 0,18	0,4406	0,9664	0,7131	0,4794

\* Valores mais ou menos são média ajustada ± erro padrão.

<sup>†</sup> p-valores calculados com o uso de ANCOVA; <sup>§</sup> p-valores entre subgrupos calculados com o uso de ANCOVA. Múltiplas comparações foram ajustadas por Tukey.

Tabela 4 – Parâmetros hematológicos pré e pós-terapia periodontal de suporte nos subgrupos de periodontite.							
	Subgrupos Periodontite Grave*			p-valores			
Variáveis	Periodontite Agressiva Generalizada (GAgP)	Periodontite Agressiva Localizada (LAgP)	Periodontite Crônica Generalizada (GCP)	Comparação entre os Subgrupos – Teste F <sup>†</sup>	GAgP vs LAgP <sup>§</sup>	GAgP vs GCP <sup>§</sup>	LAgP vs GCP <sup>§</sup>
Eosinófilos (mm <sup>3</sup> ) referências: 45 a 400	143,65 ± 41,92	214,29 ± 38,38	174,67 ± 27,30	0,4625	0,4374	0,8143	0,6887
Basófilos (mm <sup>3</sup> ) referências: 0 a 100	16,62 ± 8,64	10,92 ± 7,92	13,11 ± 5,68	0,8840	0,8741	0,9411	0,9740
Linfócitos (mm <sup>3</sup> ) referências: 900 a 3300	1939,53 ± 153,83	2397,50 ± 132,14	1970,61 ± 89,95	<b>0,0372</b>	0,1100	0,9840	<b>0,0357</b>
Monócitos (mm <sup>3</sup> ) referências: 90 a 800	384,91 ± 57,47	353,58 ± 54,42	365,58 ± 36,34	0,9282	0,9234	0,9556	0,9823
Neutrófilos (mm <sup>3</sup> ) referências: 2295 a 6500	3397,12 ± 903,39	2890,54 ± 542,42	3153,11 ± 391,02	0,8672	0,8785	0,9684	0,9205
Leucócitos Totais (mm <sup>3</sup> ) referências: 4500 a 10000	6028,84 ± 628,26	6124,48 ± 593,06	5868,24 ± 411,66	0,9360	0,9933	0,9751	0,9357

\* Valores mais ou menos são média ajustada ± erro padrão.

<sup>†</sup> p-valores calculados com o uso de ANCOVA; <sup>§</sup> p-valores entre subgrupos calculados com o uso de ANCOVA. Múltiplas comparações foram ajustadas por Tukey.

### 5.1.1 ELISA pré e pós-Terapia Periodontal Não Cirúrgica

No grupo periodontite, as amostras dos grupos de doença (LAgP, GAgP, GCP) apresentaram maior quantidade de TGF-β anteriormente à terapia, no entanto não houve diferença estatisticamente significativa quando os níveis de TGF-β foram comparados antes e pós-terapia para todos os grupos (Figura 3). Além disso, os níveis de TGF-β foram estatisticamente maiores nos pacientes com LAgP ( $p < 0.05$ ) e

GCP ( $p<0.01$ ) em relação aos controles anteriormente à terapia. A IL-6 não foi detectável em nenhum grupo de doença e momento analisados.

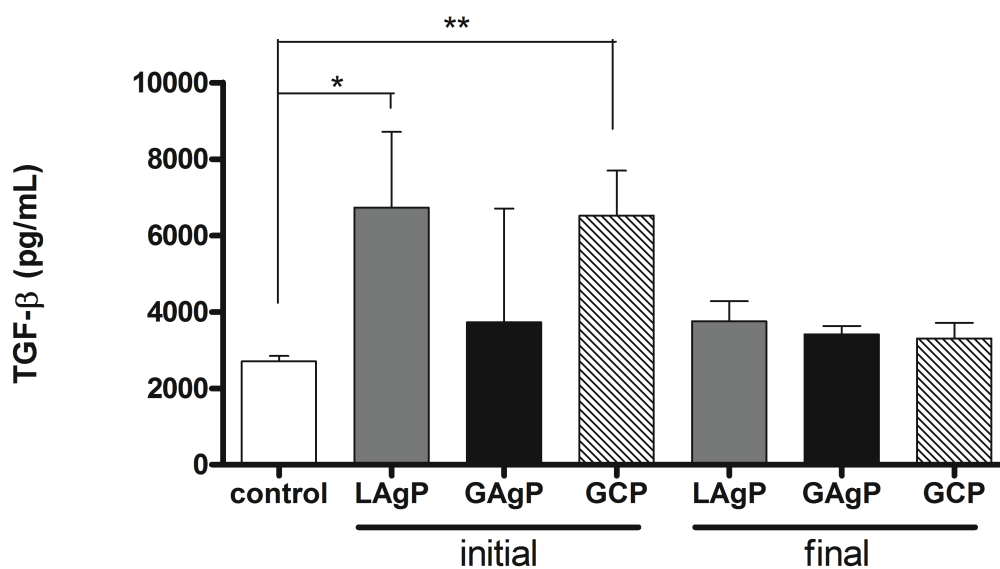


Figura 3 – Níveis séricos de TGF- $\beta$  pré e pós-tratamento

## 6 DISCUSSÃO

Em indivíduos susceptíveis à DP, a não resolução natural da inflamação periodontal resulta em uma inflamação crônica, que pode ter impacto sistêmico (11,66-70). A resposta inflamatória aguda é protetora, mas um fracasso para remover as células inflamatórias, neutrófilos especialmente, caracteriza a lesão crônica, destrutiva e patológica (11). Portanto, torna-se evidente a partir dos dados, que os três aspectos da patogênese da DP: infecção, inflamação e imunidade adaptativa têm um papel potencial e impacto na resposta imunoinflamatória sistêmica, que tanto iniciam ou medeiam uma gama de doenças sistêmicas (11).

Anteriormente a este estudo, foram encontrados níveis de proteína C-reativa ultrasensível (hs-CRP)  $>0,3$  mg/dL em indivíduos com periodontite grave em comparação a indivíduos controles (60,87 versus 23,08 respectivamente;  $p=0,0216$ ) (24) e a terapia periodontal foi associada com o decréscimo dos níveis de hs-CRP circulantes no soro e aumento de lipoproteína de alta densidade (HDL).

O presente estudo investigou a contagem de WBC no sangue periférico e os níveis de TGF- $\beta$  nos três grupos de DP grave (GAgP, LAgP e GCP), bem como os efeitos da terapia periodontal não cirúrgica sobre os mesmos.

Nota-se que os tecidos periodontais doentes apresentam elevada expressão de citocinas reguladoras, como o TGF- $\beta$  (71). Embora as células Tregs e Th17 desempenhem papéis diferentes durante a patogênese da infecção, tem sido demonstrado que existe uma via de desenvolvimento recíproco. Células T *naïve* expostas ao TGF- $\beta$  sobrerregulam a Foxp3 e tornam-se células Tregs induzidas, porém, quando cultivadas com TGF- $\beta$  e IL-6, as células T *naïve* geram células Th17 com atividades patológicas (osteoclastogênese). Assim, quando a resposta imunológica não está ativada, o TGF- $\beta$  favorece a geração de células Tregs induzidas que suprimem a inflamação. No entanto, quando uma infecção torna-se estabelecida, por exemplo, durante a gengivite ou fase precoce da periodontite, a IL-6 é sintetizada, durante a resposta imunológica inata, inibindo a geração de células Tregs e induzindo à diferenciação de células Th17 que são pró-inflamatórias e pró-

reabsorção na presença de TGF- $\beta$  (31).

Este estudo demonstrou, anteriormente à terapia periodontal, um aumento nos níveis de TGF- $\beta$  no soro de pacientes com LAgP e GCP comparados aos controles (Figura 3). Isso sugere uma repercussão sistêmica da doença, em que o TGF- $\beta$  em pacientes com periodontite aparece como um componente molecular associado à imunossupressão da resposta inflamatória, pois os níveis de TGF- $\beta$  foram maiores nestes em relação aos controles. Os níveis de IL-6 não foram mostrados, pois esta citocina não foi detectável nas amostras.

Uma vez que a prevalência de LAgP é menor (34,63,72), o critério de agrupamento adotado permitiu também a obtenção de um número maior de indivíduos com doença grave no grupo periodontite (Tabelas 1 e 2). No entanto, a análise destes indivíduos também em subgrupos da DP (LAgP, GAgP e GCP) torna-se justificada por estudos anteriores (56,60,72,73) terem demonstrado uma distinção biológica em relação aos marcadores inflamatórios sistêmicos entre a AgP e CP.

A contagem de WBC caracteriza-se como marcador não refinado de inflamação sistêmica e correlaciona-se com a resposta do hospedeiro quanto a uma variedade de estímulos. Este marcador também tem sido associado com uma previsão significativa de eventos cardiovasculares futuros e intolerância à glicose em diferentes populações (74,75).

O número de eosinófilos, basófilos, linfócitos, monócitos, neutrófilos e leucócitos totais encontrado nos pacientes com periodontite grave neste estudo (Tabela 2) não configurou um quadro de leucocitose, indicando que a inflamação sistêmica suscitada pela infecção periodontal foi menos pronunciada. Isso também sugere que, em geral, os pacientes participantes no estudo tinham saúde sistêmica e a terapia periodontal não produziu mudanças na contagem diferencial para leucócitos.

Estes resultados confirmaram os dados de estudos anteriores (76,77) que demonstram que células mononucleares do sangue periférico de pacientes com periodontite não proliferaram em resposta aos antígenos bacterianos. No entanto, outros estudos (78,79) confirmaram um número maior de leucócitos totais e neutrófilos no sangue periférico de pacientes com periodontite moderada a grave,

com uma relação positiva entre gravidade da doença e número de leucócitos no sangue.

Recentemente, foi demonstrado um aumento significativo no número de neutrófilos no sangue periférico de pacientes com GAgP (79). No presente estudo, após a terapia periodontal, o número de linfócitos nos pacientes com LAgP foi estatisticamente maior que em pacientes com GCP ( $p < 0,0357$ ) (Tabela 4). Entre os outros subgrupos (GAgP versus LAgP e GAgP versus GCP) não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 4). Os números de linfócitos nos três subgrupos foram, em ordem decrescente, LAgP > GCP > GAgP, similarmente ao reportado por Berglundh *et al.* (2001) (80). Estes autores compararam a composição das lesões gengivais de 21 indivíduos com CP e seis crianças LAgP. Avaliações estereológicas e análise histoquímica revelaram que os linfócitos e células B, em especial, ocuparam frações de volume significativamente maior na LAgP do que na CP. Também, Cairo *et al.* (2010) (56) encontraram uma forte resposta de anticorpos no soro para agentes infecciosos na LAgP e pobre resposta de anticorpos no soro para a GAgP.

Os níveis séricos de várias citocinas em pacientes com periodontite foram investigados em diversos estudos anteriores, e muitas vezes, os resultados são controversos (18,54,61). As contradições nos dados existentes foram provavelmente causadas pela heterogeneidade entre os vários indivíduos, diferentes susceptibilidades à DP, diferenças na microbiota bucal e baixos níveis de citocinas no soro (54).

Uma vez que Th1, Th2 e Th17 são mutuamente inibidoras, pode-se argumentar que a ação simultânea das células T no desenvolvimento da periodontite seria improvável, e que estas subpopulações de células T podem levar independentemente à progressão da DP. No entanto, mais estudos ainda são necessários para a determinação exata do *crosstalk* entre citocinas de células T auxiliares na DP e seu impacto na evolução da doença (40).

Diferentes combinações de moléculas de adesão e seus ligantes, ou a expressão de citocinas e quimiocinas distintas no microambiente, contribuem para as diferenças de recirculação ou recrutamento seletivo de subpopulações celulares

para os locais de inflamação, o que por sua vez, pode influenciar o resultado da doença (59).

Sabe-se ainda que a ausência de células Tregs torna-se indicação para uma grande variedade de distúrbios, tais como autoimunidade, dermatite, periodontite e mesmo rejeição de transplantes. Uma opção de tratamento em potencial para esses transtornos torna-se em aumentar o número de Tregs em sítios locais (81,82). Os métodos atuais para a expansão *in vivo* de Tregs contam com terapias biológicas, que não são específicas de Tregs, e estão associadas com muitos efeitos colaterais adversos. Formulações sintéticas capazes de induzir Tregs poderiam ser uma estratégia alternativa para atingir um aumento *in situ* em números de Tregs. O desenvolvimento e testes *in vitro* de uma formulação sintética de Tregs indutoras que consistiam de veículos de liberação controlada de IL-2, TGF- $\beta$  e rapamicina foi relatada (combinação de citocinas e droga que foram previamente reportadas para indução de Tregs). A IL-2, TGF- $\beta$  e rapamicina são liberados ao longo de três a quatro semanas a partir destas formulações. Além disso, Tregs induzidas na presença destas formulações expressaram os marcadores estabelecidos para Tregs (fenótipo) e suprimiram a proliferação e função de células T *naïve* a níveis semelhantes ao fator solúvel indutor de Tregs, bem como a ocorrência natural de Tregs. Essas formulações também foram capazes de induzir Tregs Foxp3<sup>+</sup> em células humanas *in vitro*. Em geral, os autores relataram que a combinação destas formulações de micropartículas tem potencial de serem utilizadas *in vivo* para indução de Tregs em sítios locais de rejeição de transplantes ou de autoimunidade (82).

Outro critério estabelecido no estudo com o intuito de aperfeiçoar possíveis falhas de trabalhos anteriores refere-se ao que se determinou como conclusão da terapia. Quando se lê nos artigos publicados “avaliação pós-terapia periodontal”, nota-se que não há uma uniformidade quanto à confirmação clínica de tal resolução. A maioria dos estudos determinaram que novos dados seriam coletados após conclusão da terapia, sem no entanto, mencionarem que, efetivamente, a remissão dos sinais clínicos foi aferida. Este estudo atendeu rigorosamente a estes princípios ao determinar, de acordo, com a resposta de cada paciente, o tempo individual de conclusão da terapia periodontal ativa. Um período de manutenção de seis meses (SPT), desde então, como conduta estritamente necessária no tratamento de



periodontite grave, constituiu outro aprimoramento metodológico do estudo.

Quanto aos efeitos da terapia periodontal não cirúrgica sobre os parâmetros periodontais clínicos, tornou-se claro um significativo decréscimo em todos estes ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 1). Ressalta-se a significativa redução do IP de  $63,61 \pm 33,64$  para  $4,83 \pm 6,73$  e SAS de  $44,46 \pm 29,35$  para  $1,63 \pm 3,35$ . O ND foi estatisticamente menor pós-terapia, devido à exodontia de dentes condenados periodontalmente ( $p = 0,0001$ ) (Tabela 1).

Este conjunto de medidas, relativas à terapia periodontal ativa e SPT garantiram adequada resposta clínica a todos os pacientes. Adicionalmente, rigoroso protocolo terapêutico e de manutenção contribuiu para o restabelecimento da função fagocitária em neutrófilos do sangue periférico (83) e redução dos níveis de hs-CRP em pacientes com DP grave (24). São achados que também apoiam as conclusões de D'Aiuto *et al.* (2004) (22,25) e Kamil *et al.* (2011) (84) ao relatarem maior redução nos níveis de marcadores inflamatórios sistêmicos entre aqueles com melhores respostas clínicas à terapia periodontal.

Com base no papel da terapia e manutenção periodontal (SPT), deve-se enfatizar que, como parte dos critérios do estudo, dos 23 pacientes que completaram o tratamento, dez (43%) completaram em nove meses, dez (43%) em dez meses e três (14%) em doze meses. As amostras de sangue, pós-terapia, para quantificar os níveis de TGF- $\beta$  e contagem de WBC foram coletadas apenas após a resolução da inflamação periodontal, ou seja, entre nove e doze meses após o início do estudo, dependendo da resposta de cada paciente à terapia. Tal conduta permitiu, com maior segurança, verificar os efeitos da terapia sobre os níveis de TGF- $\beta$  e contagem de WBC e, assim, confirmar o papel da periodontite grave na inflamação sistêmica nestes pacientes.

Neste estudo, a antibioticoterapia sistêmica ou local não foi usada na terapia periodontal, ou mesmo o uso de qualquer outra medicação, por exemplo regimes de anti-inflamatórios, como empregados em outros estudos (7,74,85,86). Isto se pautou no fato de poderem afetar a resposta imunoinflamatória por parte do paciente e, assim, interferirem nos resultados clínicos.

O seguimento de critérios estritos de inclusão estabelecidos no estudo, condução rigorosa da terapia periodontal não cirúrgica, com tempo de

acompanhamento relativamente longo inviabilizaram uma amostra com maior número de pacientes. Pacientes fumantes, obesos e que faziam uso de qualquer medicação, principalmente, agentes anti-inflamatórios, estatinas, ou qualquer terapia hormonal foram excluídos da amostra. Dessa forma, se evitou ajustes para os efeitos destes como fatores de confusão nas análises estatísticas e, especialmente, os efeitos potenciais destes na resposta inflamatória para o tratamento periodontal.

Deve-se considerar que a interpretação dos resultados dos estudos se torna difícil devido a algumas diferenças metodológicas entre os mesmos. Amostras de pequeno tamanho, populações de estudo não comparáveis, quanto à idade, etnia, localização geográfica, diferentes medidas e definições de periodontite são aspectos que dificultam a comparação entre os resultados. Da mesma forma, os parâmetros utilizados para avaliar os efeitos do tratamento periodontal e a melhoria nos níveis circulantes de marcadores biológicos divergem entre os estudos (67,87)

Uma característica única do biofilme da cavidade bucal, particularmente do biofilme subgengival é sua estreita proximidade a tecidos altamente vascularizados. Qualquer rompimento da integridade natural do epitélio subgengival, cuja espessura é no máximo dez camadas, pode levar à bacteremia (88). Na periodontite, por sua vez, o epitélio da bolsa periodontal é caracteristicamente fino e ulcerado e, por isto, frequentemente se abre, permitindo o acesso das bactérias ao tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. Em pacientes com periodontite moderada a grave, a área total do epitélio da bolsa em contato direto com o biofilme subgengival é surpreendentemente grande, podendo chegar ao tamanho aproximado ao da palma da mão humana ou, em casos de doença avançada, muito maior (89). Portanto, ambos, o acesso de micro-organismos à corrente sanguínea e a instalação de uma inflamação crônica com área e intensidade suficientes para suscitar significativa resposta do hospedeiro fornecem a base para o estudo da inter-relação entre DP e DCV, obesidade, entre outras.

Dessa forma, a complexidade dos processos imunológicos envolvidos na resposta do hospedeiro conduz a diferenças na manifestação e progressão da DP (40), o que leva à necessidade de diferentes abordagens terapêuticas.

Novos tratamentos para a DP devem abordar a importante contribuição das células imunológicas na reabsorção óssea, particularmente no tocante ao curso

natural da doença (períodos de remissão e progressão) (32). Os tratamentos atuais para a DP, embora obtenham excelentes resultados clínicos locais e sistêmicos, dependem de procedimentos mecânicos (raspagem e alisamento radicular), pois o biofilme dentário deve ser desorganizado e sempre que possível eliminado. Porém, tais procedimentos negligenciam, na maioria das vezes, as células imunológicas. No entanto, com base no entendimento atual das respostas imunológicas, torna-se essencial reavaliar as formas de tratamento já disponíveis para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que visam o controle da perda óssea alveolar provocada pela resposta imunológica mediada por células. Como exemplo, pode-se citar a inibição da produção e/ou expressão de RANKL (atuação na transcrição e/ou tradução) pelas células imunológicas ativadas e/ou bloqueio da interação fisiológica RANKL-RANK. Embora os modelos animais tenham demonstrado resultados promissores para várias abordagens terapêuticas, alguns problemas de efeitos secundários são apontados.

Uma vez que a DP caracteriza-se como infecção polimicrobiana, patógenos podem modular a resposta de células T para promover sua própria capacidade de adaptação, e a resposta imunológica em si torna-se uma mistura de respostas imunológicas mediadas por todos os micro-organismos representados no biofilme (32, 40). Portanto, pode não ser possível dissecar padrões de atividade dominante de Th1, Th2, Th17 ou Tregs de forma confiável entre as amostras de tecido periodontal doente coletadas. Assim, pode ser mais simples e mais produtivo considerar os papéis de cada citocina Th1, Th2, Th17 ou Tregs na infecção periodontal, já que torna-se notável o desempenho das células T na manutenção da homeostasia entre micro-organismos do biofilme e hospedeiro.

Ainda é incerto quais vias de sinalização específicas precisam ser bloqueadas para atenuar a doença ou aprimoradas para promover a defesa do hospedeiro. Por outro lado, a modulação do sistema imunológico do hospedeiro por meio de fármacos pode resultar em efeitos adversos secundários, o que exige monitoramento cuidadoso desta abordagem (82). Portanto, estudos adicionais são necessários para entender o início e progressão da DP e desenvolver intervenções terapêuticas para controlá-las.

## 7 CONCLUSÕES

Os critérios estabelecidos para o alcance de redução e remissão dos sinais clínicos de inflamação da doença e a eficiente terapia de suporte individualizada adotada constituíram importantes diferenciais metodológicos deste estudo. A adoção de tais critérios assegurou eficácia da terapia periodontal mecânica na resolução clínica da doença.

A partir dos resultados observados quanto aos índices dos marcadores biológicos de inflamação leucócitos e TGF- $\beta$ , antes e após terapia periodontal, pode-se concluir que:

- A não existência de diferença na contagem de leucócitos, após terapia periodontal não cirúrgica, entre os indivíduos com periodontite e controle confirma que esse constitui um marcador não específico de inflamação. Tal constatação é consonante com o estado inflamatório de baixo grau observado na doença periodontal;

- Não obstante o número de linfócitos não apresentar diferença significativa entre os indivíduos com periodontite e os controles antes da terapia periodontal, a elevação do número de linfócitos em pacientes com LAgP, após terapia periodontal, demonstra a existência de um perfil inflamatório distinto na LAgP. O certo de grau de imunossupressão durante a doença, apontado por esse perfil, foi confirmado pelo sensível aumento do número de linfócitos mediante a resolução clínica do quadro;

- O aumento nos níveis de TGF- $\beta$  no soro de pacientes com LAgP e GCP, comparados aos controles, significa que este consiste em um componente de imunossupressão da resposta inflamatória e, provavelmente, age como uma citocina anti-inflamatória. Além disso, a elevação dos níveis séricos sugere uma repercussão sistêmica da doença periodontal.

## REFERÊNCIAS

1. Sanz M, Winkelhoff AJV. Periodontal infections: understanding the complexity – Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 2011; 38 (Suppl. 11):3-6.
2. Albandar JM, Rams TE. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontol* 2000 2002; 29:7-10.
3. Papapanou PN. Epidemiology of periodontal diseases: an update. *J Int Acad Periodontol* 1999; 1:110-116.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Atenção Básica. Coordenação Geral de Saúde Bucal. Projeto SBBrazil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal - Resultados Principais. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2011. 92p.
5. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology* 2000 1994; 5:7-25.
6. Hernichel-Gorbach E, Kornman KS, Holt SC, Nichols F, Meador H, Kung JT, et al. Host responses in patients with generalized refractory periodontitis. *J Periodontol* 1994; 65:8-16.
7. Ebersole J, Machen R, Steffen M, Willmann D. Systemic acute-phase reactants, C-reactive protein and haptoglobin in adult periodontitis. *Clin Exp Immunol* 1997; 107:347-352.
8. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Periodontol* 2005; 43:5721-5732.
9. Slade GD, Offenbacher S, Beck JD, Heiss G, Pankow JS. Acute-phase inflammatory response to periodontal disease in the US population. *J Dent Res* 2000; 79:49-57.
10. Offenbacher S, Elter JR, Lin D, Beck JD. Evidence for periodontitis as a tertiary vascular infection. *J Int Acad Periodontol* 2005; 7(2):39-48.
11. Linden GJ, Lyons A, Scannapieco FA. Periodontal systemic associations: review of the evidence. *J Clin Periodontol* 2013; 40 (Suppl. 14):S8–S19.

12. Taba Jr M, Kinney J, Kim AS, Giannobile WV. Diagnostic Biomarkers for Oral and Periodontal Diseases. *Dent Clin North Am* 2005; 49(3):551-vi.
13. Williams RC, Offenbacher S. Periodontal medicine: the emergence of a new branch of periodontology. *Periodontol 2000* 2000; 23:9-12.
14. Loo WTY, Yue Y, Fan Cb, Bai Lj, Dou Yd, Wang M, et al. Comparing serum levels of cardiac biomarkers in cancer patients receiving chemotherapy and subjects with chronic periodontitis. *J Transl Med* 2012; 10(Suppl 1):1-7.
15. de Brito Bezerra B, Andriankaja O, Kang J, Pacios S, Bae HJ, Li Y, et al. *A. actinomycetemcomitans* induced periodontal disease promotes systemic and local responses in rat periodontium. *J Clin Periodontol* 2012; 39:333-341.
16. Kobayashi R, Kono T, Bolerjack BA, Fukuyama Y, Gilbert RS, Fujihashi K, et al. Induction of IL-10-producing CD4<sup>+</sup> T-cells in chronic periodontitis. *J Dent Res* 2011; 90(5):653-658.
17. Glowacki AJ, Yoshizawa S, Jhunjhunwala S, Vieira AE, Garlet GP, Sfeir C, et al. Prevention of inflammation-mediated bone loss in murine and canine periodontal disease via recruitment of regulatory lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110(46):18525-18530.
18. Zhao L, Zhou Y, Xu Y, Sun Y, Li L, Chen W. Effect of non-surgical periodontal therapy on the levels of Th17/Th1/Th2 cytokines and their transcription factors in Chinese chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2011; 38:509-516.
19. D'Aiuto F, Ready D, Tonetti MS. Periodontal disease and C-reactive protein-associated cardiovascular risk. *J Periodontol Res* 2004; 39:236-241.
20. D'Aiuto F, Parkar M, Brett PM, Ready D, Tonetti MS. Gene polymorphisms in pro-inflammatory cytokines are associated with systemic inflammation in patients with severe periodontal infections. *Cytokine* 2004; 28:29-34.
21. Fitzsimmons TR, Sanders AE, Bartold PM, Slade GD. Local and systemic biomarkers in gingival crevicular fluid increase odds of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2010; 37: 30-36.
22. D'Aiuto F, Parkar M, Andreaou G, Brett PM, Ready D, Tonetti MS. Periodontitis and atherogenesis: causal association or simple coincidence? A pilot intervention study. *J Clin Periodontol* 2004; 31:402-411.
23. Kornman KS, Duff GW. Candidate genes as potential links between periodontal and cardiovascular diseases. *Annales of Periodontology* 2001; 6:48-57.

24. Leite ACE, Carneiro VMA, Guimarães MCM. Effects of periodontal therapy on C-reactive protein and HDL in serum of subjects with periodontitis. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2014; 29(1):69-77.
25. D'Aiuto F, Parkar M, Andreou G, Suvan J, Brett PM, Ready D, et al. Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. *J Dent Res* 2004; 83(2):156-160.
26. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4:1-6.
27. Mombelli A, Casagni F, Madianos PN. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J Clin Periodontol* 2002; 29(Suppl 3):10-21.
28. Cairo F, Nieri M, Gori AM, Tonelli P, Branchi R, Castellani S, et al. Markers of systemic inflammation in periodontal patients: chronic versus aggressive periodontitis. An explorative cross-sectional study. *Eur J Oral Implantol* 2010; 3(2):147-153.
29. Papapanou PN, Neiderud AM, Disick E, Lalla E, Miller GC, Dahlén G. Longitudinal stability of serum immunoglobulin G responses to periodontal bacteria. *J Clin Periodontol* 2004; 31:985-990.
30. Dye BA, Choudhary K, Shea S, Papapanou PN. Serum antibodies to periodontal pathogens and markers of systemic inflammation. *J Clin Periodontol* 2005; 32:1189-1199.
31. Hernández M, Dutzan N, García-Sesnich, Abusleme L, Dezerega A, Silva N, et al. Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. *J Dent Res* 2011; 90(10):1164-1170.
32. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol* 2014; 35(1):3-11.
33. Hans M, Hans VM. Toll-like receptors and their dual role in periodontitis: a review. *J Oral Sci* 2011; 53(3):263-271.
34. Armitage GC, Cullinan MP. Comparison of the clinical features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000* 2010; 53:12-27.
35. Gemmell E, Seymour GJ. Cytokine profiles of cells extracted from humans with periodontal diseases. *J Dent Res* 1998; 77:16-26.

36. Gonzalez OA, Novak MJ, Kirakodu S, Orraca L, Chen K-C, Stromberg A, et al. Comparative analysis of gingival tissue antigen presentation pathways in ageing and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2014; 41:327-339.
37. Donati M, Liljenberg B, Zitzmann NU, Berglundh T. B-1a cells and plasma cells in periodontitis lesions. *J Periodont Res* 2009; 44:683-688.
38. Mkonyi LE, Bakken V, Søvik JB, Mauland EK, Fristad I, Barczyk MM, et al. Lymphangiogenesis is induced during development of periodontal disease. *J Dent Res* 2012; 91(1):71-77.
39. Erciyas K, Orbak R, Kavrut F, Demir T, Kaya H. The changes in T lymphocyte subsets following periodontal treatment in patients with chronic periodontitis. *J Periodont Res* 2006; 41:165-170.
40. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res* 2010; 89(12):1349-1363.
41. Houry-Haddad Y, Wilensky A, Shapira L. T-cell phenotype as a risk factor for periodontal disease. *Periodontol 2000* 2007; 45:67-75.
42. Berglundh T, Donati M, Zitzmann N. B cells in periodontitis – friends or enemies? *Periodontol 2000* 2007; 45:51-66.
43. Gaffen SL, Hajishengallis G. A new inflammatory cytokine on the block: re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. *J Dent Res* 2008; 87(9):817-828.
44. Amunulla A, Venkatesan R, Ramakrishnan H, Arun KV, Sudarsan S, Talwar A. Lymphocyte subpopulation in healthy and diseased gingival tissue. *J Indian Soc Periodontol* 2008; 12(2):45-50.
45. Aranha AMF, Repeke CE, Garlet TP, Vieira AE, Campanelli AP, Trombone APF, et al. Evidence supporting a protective role for Th9 and Th22 cytokines in human and experimental periapical lesions. *J Endod* 2013; 39:83-87.
46. Konermann A, Beyer M, Deschner J, Allam JP, Novak N, Winter J, et al. Human periodontal ligament cells facilitate leukocyte recruitment and are influenced in their immunomodulatory function by Th17 cytokine release. *Cell Immunol* 2012; 272:137-143.
47. Yokoyama M, Ukai T, Ayon Haro ER, Kishimoto T, Yoshinaga Y, Hara Y. Membrane-bound CD40 ligand on T cells from mice injected with



- lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis. *J Periodont Res* 2011; 46:464-474.
48. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihiro S, Seki M, Karimbux NY, et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol* 2006; 169:987-998.
  49. da Luz FA, Oliveira AP, Borges D, Brígido PC, Silva MJ. The physiopathological role of IL-33: new highlights in bone biology and a proposed role in periodontal disease. *Mediators Inflamm* 2014; 2014:342410.
  50. Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13(1):17-34.
  51. Sigusch BW, Wutzler A, Nietzsche T, Glockmann E. Evidence for a specific crevicular lymphocyte profile in aggressive periodontitis. *J Periodont Res* 2006; 41:391-396.
  52. Artese L, Simon MJ, Piattelli A, Ferrari DS, Cardoso LAG, Favari M. Immunohistochemical analysis of inflammatory infiltrate in aggressive and chronic periodontitis: a comparative study. *Clin Oral Invest* 2011; 15:233-240.
  53. Gümüş P, Nizam N, Lappin DF, Buduneli N. Saliva and serum levels of B-cell activating factors and tumor necrosis factor- $\alpha$  in patients with periodontitis. *J Periodontol* 2014; 85:270-280.
  54. Andrukhov O, Ulm C, Reischl H, Nguyen PQ, Matejka M, Rausch-Fan X. Serum cytokine levels in periodontitis patients in relation to the bacterial load. *J Periodontol* 2011; 82:885-892.
  55. Ebersole JL, Taubman MA, Smith DJ, Frey DE, Haffajee AD, Socransky SS. Human serum antibody responses to oral microorganisms. IV. Correlation with homologous infection. *Oral Microbiol Immunol* 1987; 2:53-59.
  56. Cairo F, Nieri M, Gori AM, Tonelli P, Branchi R, Castellani S, et al. Markers of systemic inflammation in periodontal patients: chronic versus aggressive periodontitis. An explorative cross-sectional study. *Eur J Oral Implantol* 2010; 3(2):147-153.
  57. D'Aiuto F, Nibali L, Parkar M, Patel K, Suvan J, Donos N. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. *J Dent Res* 2010; 89(11):1241-1246.

58. Picolos DK, Lerche-Sehm J, Abron A, Fine FB, Papapanou PN. Infection patterns in chronic and aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005; 32:1055-1061.
59. Lima PMA, Souza PEA, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, Dutra WO. Aggressive and chronic periodontitis correlate with distinct cellular sources of key immunoregulatory cytokines. *J Periodontol* 2011; 82:86-95.
60. Nowak M, Krämer B, Haupt M, Papapanou N, Kebschull J, Hoffmann P, et al. Activation of invariant NK T cells in periodontitis lesions. *J Immunol* 2013; 190:2282-2291.
61. Duarte PM, da Rocha M, Sampaio E, Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, et al. Serum levels of cytokines in subjects with generalized chronic and aggressive periodontitis before and after non-surgical periodontal therapy: a pilot study. *J Periodontol* 2010; 81:1056-1063.
62. D'Aiuto F, Nibali L, Mohamed-Ali V, Vallance P, Tonetti MS. Periodontal therapy: a novel non-drug-induced experimental model to study human inflammation. *J Periodontal Res* 2004; 39:294-299.
63. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4:1-6.
64. The World Health Report 2000. Health Systems: Improving Performance. On World Health Organization web site at [http://www.who.int/whr/2000/en/whr00\\_en.pdf](http://www.who.int/whr/2000/en/whr00_en.pdf)
65. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* 1975; 25(4):229-235.
66. Taylor JJ, Preshaw PM, Lalla E. A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *J Clin Periodontol* 2013; 40(Suppl. 14):S113-S134.
67. D'Aiuto F, Orlandi M, Gunsolley JC. Evidence that periodontal treatment improves biomarkers and CVD outcomes. *J Clin Periodontol* 2013; 40 (Suppl. 14):S85-S105.
68. Dietrich T, Sharma P, Walter C, Weston P, Beck J. The epidemiological evidence behind the association between periodontitis and incident atherosclerotic cardiovascular disease. *J Clin Periodontol* 2013; 40 (Suppl. 14):S70-S84.

69. Ide M, Papapanou PN. Epidemiology of association between maternal periodontal disease and adverse pregnancy outcomes – systematic review. *J Clin Periodontol* 2013; 40 (Suppl. 14):S181-S194.
70. Linden GJ, Herzberg MC and on behalf of working group 4 of the joint EFP/AAP workshop. Periodontitis and systemic diseases: a record of discussions of working group 4 of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Clin Periodontol* 2013; 40 (Suppl. 14):S20-S23.
71. Cardoso CR, Garlet GP, Moreira AP, Júnior WM, Rossi MA, Silva JS. Characterization of CD4+CD25+ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. *J Leukoc Biol* 2008; 84:311-318.
72. Nibali L, D'Aiuto F, Donos N, Griffiths GS, Parkar M, Tonetti MS, et al. Association between periodontitis and common variants in the promoter of the interleukin-6 gene. *Cytokine* 2009; 45:50-54.
73. Shi D, Meng H, Xu L, Zhang L, Chen Z, Feng X et al. Systemic inflammation markers in patients with aggressive periodontitis: a pilot study. *J Periodontol* 2008; 79:2340-2346.
74. D'Aiuto F, Parkar M, Nibali L, Suvan J, Lessem J, Tonetti MS. Periodontal infections cause changes in traditional and novel cardiovascular risk factors: results from a randomized controlled clinical trial. *Am Heart J* 2006; 151:977-984.
75. Graziani F, Cei S, Tonetti M, Paolantonio M, Serio R, Sammartino G, et al. Systemic inflammation following non-surgical and surgical periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 2010; 37:848-854.
76. Figueira EA, de Rezende MLR, Torres SA, Garlet GP, Lara VS, Santos CF, et al. Inhibitory signals mediated by programmed death-1 are involved with T-cell function in chronic periodontitis. *J Periodontol* 2009; 80:1833-1844.
77. do Vale CH, de Oliveira Fraga LA, Costa AS, Tavares CA, Martins-Filho OA, de Macedo Farias L. Antiproliferative activity of *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *actinomycetemcomitans* and *Fusobacterium nucleatum* in peripheral blood mononuclear cells. *Res Microbiol* 2004; 155(9):731-740.
78. Pejčić A, Kesić L, Pešić Z, Mirković D, Stojanović M. White blood cell count in different stages of chronic periodontitis. *Acta Clin Croat* 2011; 50:159-167.

79. Gaddale R, Mudda JA, Karthikeyan I, Desai SR, Shinde H, Deshpande P. Changes in cellular and molecular components of peripheral blood in patients with generalized aggressive periodontitis. J Investig Clin Dent 2014 Oct 6. [Epub ahead of print]
80. Berglundh T, Wellfelt B, Liljenberg B, Lindhe J. Some local and systemic immunological features of prepubertal periodontitis. J Clin Periodontol 2001; 28:113-120.
81. Gonzales JR, Groeger S, Johansson A, Meyle J. T helper cells from aggressive periodontitis patients produce higher levels of interleukin-1 beta and interleukin-6 in interaction with *Porphyromonas gingivalis*. Clin Oral Investig 2014; 18(7):1835-1843.
82. Jhunhunwala S, Balmert SC, Raimondi G, Dons E, Nichols EE, Thomson AW, et al. Controlled release formulations of IL-2, TGF- $\beta$ 1 and rapamycin for the induction of regulatory T cells. J Control Release 2012; 159:78-84.
83. Carneiro VM, Bezerra AC, Guimarães Md, Muniz-Junqueira MI. Effects of periodontal therapy on phagocytic activity of peripheral blood neutrophils – evidence for an extrinsic cellular defect. Oral Health Prev Dent 2012; 10(2):195-203.
84. Kamil W, Al Habashneh R, Khader Y, Al Bayati L, Taani D. Effects of nonsurgical periodontal therapy on C-reactive protein and serum lipids in Jordanian adults with advanced periodontitis. J Periodont Res 2011; 46:616-621.
85. Mattila KJ, Vesanen M, Valtonen V, Nieminen M, Palosuo T, Rasi V, et al. Effect of treating periodontitis on C-reactive protein levels: a pilot study. BMC Infect Dis 2002; 2:30-33.
86. Tüter G, Serdar M, Kurtis B, Walker SG, Atak A, Toyman U, et al. Effects of scaling and root planing and subantimicrobial dose doxycycline on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-8, -13 and serum levels of HsCRP in patients with chronic periodontitis. J Periodontol 2010; 81:1132-1139.
87. Engebretson S, Kocher T. Evidence that periodontal treatment improves diabetes outcomes: a systematic review and meta-analysis. J Clin Periodontol 2013; 40 (Suppl. 14):S153-S163.

88. Parahitiyawa NB, Jin LJ, Leung WK, Yam WC, Samaranayake LP. Microbiology of odontogenic bacteremia: beyond endocarditis. Clin Microbiol Rev 2009; 22(1):46-64.
89. Page RC. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. Ann Periodontol 1998; 3:108-120.

**ANEXOS****ANEXO A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA**

Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

**PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA**

Registro do Projeto no CEP: 045/2008

CAAE: 0067.0.012.012-08

Título do Projeto: “Mediadores inflamatórios e funções fagocitárias local e sistêmica na Periodontite Agressiva Localizada e Periodontite Agressiva Generalizada antes e após terapia periodontal”.

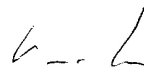
Pesquisadora Responsável: Valéria Martins de Araújo

Data de entrada: 10/03/2008

Com base nas Resoluções 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética da pesquisa em seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto 045/2008 com o título: “Mediadores inflamatórios e funções fagocitárias local e sistêmica na Periodontite Agressiva Localizada e Periodontite Agressiva Generalizada antes e após terapia periodontal”, analisado na 5ª Reunião Ordinária, realizada no dia 10 de Junho de 2008.

A pesquisadora responsável fica, desde já, notificada da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 11 de Junho de 2008.

  
Prof. Volnei Garrafa  
Coordenador do CEP-FS/UnB